

**Chemisch Induzierte Resistenz
im Pathosystem Gerste – Echter Gerstenmehltau:
Identifizierung und Charakterisierung differentiell
exprimierter Gene der Gerste**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung
des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften
im Fachbereich Biologie der Justus-Liebig-Universität Gießen

Tag der Disputation: 28. Mai 2001

vorgelegt von
Diplom-Biologin Katrin Beßer
aus Duisburg

Gutachter: Prof. Dr. Karl-Heinz Kogel
Gutachter: Prof. Dr. Klaus Zetsche
Dekan: Prof. Dr. Jürgen Janek

Veröffentlichungen im Rahmen dieser Arbeit

referiert:

- Beßer, K., Jarosch, B., Langen, G. and Kogel, K.H. (2000) Expression analysis of genes induced in barley after chemical activation reveals distinct disease resistance pathways. *Mol Plant Pathol* 1(5), 277-286.
- Hause, B., Vörös, K., Kogel, K.H., Beßer, K. and Wasternack, C. (1999) A jasmonate-responsive lipoxygenase of barley leaves is induced by plant activators but not by pathogens. *J. Plant Physiol.* 154, 459-462.
- Kogel *et al.* (in Vorbereitung) BCI-4, a new element in chemically Induced Resistance in cereals.
- Langen, G., Beßer, K. and Kogel, K.H. (2000) Identification and expression analysis of genes induced in barley after chemical activation of disease resistance. *Acta Phytopathol. Entomol. Hungarica* 35 (1-4), 1.
- Langen, G., Pons, J., Beckhove, U., Schiffer, R., Beßer, K., Hückelhoven, R., Stein, E. and Kogel, K.H. (in Vorbereitung) The race-non-specific *mlo* resistance interferes with basic resistance but not with induced resistance to *Blumeria graminis* f.sp. *hordei*.

nicht referiert:

- Kogel, K.H., Beckhove, U., Jarosch, B., Hückelhoven, R., Schiffer, R., Beßer, K., Langen, G. and Korell, M. (1998) Die Pflanze wehrt sich selbst. *Spiegel der Forschung*, 15. Jg./Nr.2, 54-61.
- Langen, G., Beßer, K., Jarosch, B. and Kogel, K.H. (2000) Chemically induced resistance in the barley – powdery mildew pathosystem: Functional analysis of new SAR genes in barley. *Mitt. Biol. Bundesanst. Land- Forstwirtschaft.* 376, 210.
- Langen, G., Beßer, K., Jarosch, B., Düringer, M., Stein, E. and Kogel, K.H. (2000) Identifizierung neuer Gerstengene mit breiter Wirkung auf Krankheitsresistenzen. *Spiegel der Forschung*, 17. Jg./Nr.1, 26.
- Langen G., Hückelhoven R., Beßer K., Schaffrath U. & Kogel K.H. (1998) A preliminary assessment of the role of reactive oxygen species in defence reactions of cereals against fungal pathogens. *Gesunde Pflanzen*, 50. Jahrg., Heft 7, 196-202.

Patent Anmeldungen im Rahmen dieser Arbeit

- Method of Screening for Agrochemicals (1998) Europäisches Patent EP 98124525.1
- ERS-Genes, Method of Screening for Chemical Compounds Capable of Inducing ERS in Plants (1999) Europäisches Patent EP 99110011.6

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Wirt-Pathogen-Interaktionen	1
1.2	Formen der Resistenz	1
1.3	Abwehrmechanismen	3
1.4	Signalmoleküle und Elemente von Signaltransduktionskaskaden	4
1.5	Induzierte Resistenz	6
1.5.1	Chemisch Induzierte Resistenz	8
1.5.2	Signalkaskaden der SAR	10
1.6	Das Pathosystem Gerste - Echter Gerstenmehltau	13
1.7	Zielsetzung der Arbeit	17
2	MATERIAL UND METHODEN	18
2.1	Pflanzenmaterial	18
2.2	Pathogene und Schädlinge	19
2.2.1	<i>Blumeria graminis</i>	19
2.2.2	<i>Cochliobolus sativus</i>	20
2.2.3	<i>Rhynchosporium secalis</i>	20
2.2.4	Bakterien	20
2.2.5	<i>Sitobion avenae</i>	21
2.3	Behandlung des Pflanzenmaterials	21
2.3.1	Inokulation	21
2.3.1.1	<i>Blumeria graminis</i>	21
2.3.1.2	<i>Cochliobolus sativus</i>	22
2.3.1.3	Bakterien	22
2.3.1.4	<i>Sitobion avenae</i>	22
2.3.2	Applikation chemischer Resistenzinduktoren	22
2.3.3	Applikation von Phytohormonen	23
2.3.4	Applikation von Sorbit	23
2.3.5	Verwundung	24

2.4	Mikroskopische Untersuchung der Resistenzinduktion	24
2.5	Erzeugung einer subtrahierten cDNA Bank	25
2.6	Identifizierung differentiell exprimierter Gene	26
2.6.1	Kolonie-PCR	26
2.6.2	<i>Reversed Northern-Analysen</i>	27
2.6.3	Plasmidpräparation	28
2.6.4	Sequenzierung und GenBank Sequenzvergleiche	29
2.6.5	Sondenherstellung	30
2.7	Untersuchung der Genexpression auf Transkriptionsebene	31
2.7.1	RNA-Extraktion und Konzentrationsbestimmung	31
2.7.2	<i>Northern-Analysen</i>	32
2.7.2.1	Denaturierende Agarosegelelektrophorese	32
2.7.2.2	<i>Northern Blotting</i>	32
2.7.2.3	<i>Northern-Hybridisierung</i> und RNA-Detektion	32
2.7.2.4	Entfernen von Sonden	33
2.7.2.5	RT-PCR	34
2.8	Erzeugung eines <i>full length</i>-Klons	34
2.9	Heterologe Expression in <i>E. coli</i>	36
2.9.1	Klonierungsstrategie	36
2.9.2	Biosynthese des rekombinanten Proteins	37
2.9.3	Extraktion des rekombinanten Proteins	38
2.9.4	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	39
2.9.5	Aufreinigung des rekombinanten Proteins	39
2.9.6	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	39
2.9.7	Nachweis der Proteinakkumulation	40
2.10	Untersuchung der Genexpression auf Translationsebene	40
2.10.1	Proteinextraktion	41
2.10.2	<i>Western-Analyse</i>	41
2.10.2.1	<i>Western Blotting</i>	41
2.10.2.2	Proteinnachweis mittels polyklonaler Antikörper	41
2.11	Subzelluläre Lokalisierung eines Fusionsproteins	42
2.11.1	Klonierungsstrategie	42
2.11.2	Transiente Transformation	44
2.11.3	Nachweis des Fusionsproteins	45

2.12	Nachweis einer Genfunktion	46
2.12.1	Klonierungsstrategie	46
2.12.2	Transiente Transformation	46
2.12.3	Nachweis transformierter Zellen	47
2.12.4	Mikroskopische Auswertung der Überexpression	48
3	ERGEBNISSE	49
3.1	Induktion der Resistenz von Gerste gegenüber <i>Blumeria graminis</i> f.sp. <i>hordei</i>	49
3.1.1	Cytologische Untersuchung der chemisch Induzierten Resistenz (cIR)	49
3.1.2	Überprüfung der Wirkung potentieller Resistenzinduktoren	51
3.1.2.1	<i>Blumeria graminis</i> f.sp. <i>tritici</i> als potentieller biotischer Resistenzinduktor	51
3.1.2.2	Vergleichende Analyse der Wirksamkeit chemischer Resistenz-induktoren	53
3.1.2.3	Einfluss von Abscisinsäure auf die Ausprägung der Resistenz	55
3.1.2.4	Einfluss einer mechanischen Verwundung auf die Ausprägung der Resistenz	55
3.2	Identifizierung nach chemischer Induktion differentiell exprimierter Gerstengene	56
3.3	Untersuchung der Genexpression auf Transkriptionsebene	59
3.3.1	Genexpression nach Chemischer Induktion	59
3.3.1.1	Genexpression nach Applikation der Resistenzinduktoren DCINA und BTH	59
3.3.1.2	Gewebespezifische <i>Bci</i> -Genexpression in Gerstenblättern	61
3.3.1.3	<i>Bci</i> -Genexpression nach Salicylsäure(SA)-Applikation	63
3.3.2	<i>Bci</i> -Genexpression nach Phytohormonapplikation	64
3.3.2.1	<i>Bci</i> -Genexpression nach Jasmonsäuremethylester(JM)-Applikation	64
3.3.2.2	<i>Bci</i> -Genexpression nach Sorbitapplikation	66
3.3.2.3	<i>Bci</i> -Genexpression nach Ethylenbegasung	67
3.3.2.4	<i>Bci</i> -Genexpression nach Abscisinsäure(ABA)-Applikation	68
3.3.3	<i>Bci</i> -Genexpression durch Verwundung	69
3.3.4	<i>Bci</i> -Genexpression nach Befall mit Pathogenen oder Schädlingen	70
3.3.4.1	<i>Bci</i> -Genexpression durch <i>Blumeria graminis</i> f.sp. <i>hordei</i>	70
3.3.4.1.1	<i>Bci</i> -Genexpression durch <i>Blumeria graminis</i> f.sp. <i>hordei</i>	70
3.3.4.1.2	<i>Bci</i> -Genexpression nach <i>Bgh</i> -Inokulation von chemisch induzierter Gerste	70
3.3.4.2	<i>Bci</i> -Genexpression durch Befall mit <i>Cochliobolus sativus</i>	71
3.3.4.3	<i>Bci</i> -Genexpression nach Befall mit <i>Rhynchosporium secalis</i>	72
3.3.4.4	<i>Bci</i> -Genexpression nach Befall mit <i>Blumeria graminis</i> f.sp. <i>tritici</i> (<i>Bgt</i>)	73
3.3.4.5	<i>Bci</i> -Genexpression nach Infiltration von Bakterien	73
3.3.4.6	<i>Bci</i> -Genexpression durch die Große Getreideblattlaus	77
3.3.5	<i>Bci</i> -Genexpression in anderen Getreiden	77
3.3.5.1	<i>Bci</i> -Genexpression in Weizen (<i>Triticum aestivum</i> L.)	78

3.3.5.2	<i>Bci</i> -Genexpression in Reis (<i>Oryza sativa</i> L.)	79
3.4	Charakterisierung von <i>Bci-4</i>	81
3.4.1	Erzeugung des <i>full length</i> -Klons von <i>Bci-4</i>	81
3.4.2	Herstellung des rekombinanten Proteins von <i>Bci-4</i>	84
3.4.3	Genexpression von <i>Bci-4</i>	85
3.4.3.1	Chemische Induktion der <i>Bci-4</i> -Expression	85
3.4.3.2	Gewebespezifische Expression nach chemischer Resistenzinduktion	88
3.4.3.3	Pathogeninduzierte Expression von <i>Bci-4</i>	90
3.4.4	Transiente Überexpression eines Fusionsproteins von <i>Bci-4</i> und <i>GFP</i> in Epidermiszellen von Zwiebel (<i>Allium cepa</i> L.) zur subzellulären Lokalisierung	92
3.4.5	Transiente Überexpression von <i>Bci-4</i> in Gerstenblättern zur Untersuchung des Einflusses auf die Interaktion mit dem Echtem Mehltaupilz	95
4	DISKUSSION	98
4.1	Induzierte Resistenz von Gerste gegenüber <i>Blumeria graminis</i> f.sp. <i>hordei</i>	98
4.1.1	Wirkung chemischer Resistenzinduktoren	98
4.1.2	Wirkung von Phytohormonen und Wundverletzung	100
4.1.3	Einfluss biotischer Faktoren auf die Resistenz	101
4.1.3.1	Wirkung von <i>Blumeria graminis</i> f.sp. <i>tritici</i>	101
4.1.3.2	Wirkung phytopathogener Bakterien	102
4.1.4	Bewertung der Resistenzinduktion in Gerste gegenüber <i>Bgh</i>	103
4.2	Identifizierung chemisch induzierter Gene der Gerste	104
4.2.1	14-3-3-Protein (Klon 1-62)	104
4.2.2	Annexin-ähnliches Protein (3-16)	106
4.2.3	BCI-1: Lipxygenase	106
4.2.4	BCI-2: Thionin	109
4.2.5	BCI-3/BCI-6: Saure Phosphatasen	110
4.2.6	BCI-4: Ca ²⁺ -bindendes <i>EF-hand</i> -Protein	112
4.2.7	BCI-5: Plastidenspezifisches ribosomales Protein	118
4.2.8	BCI-7: Serin-Proteinaseinhibitor	119
4.2.9	BCI-8: Fettsäuredesaturase	120
4.2.10	BCI-9: Apyrase	122
4.2.11	PR-1b: <i>Pathogenesis-related protein 1b</i>	123
4.3	Abschließende Betrachtung und Einordnung der <i>Bci</i>-Gene	124
5	ZUSAMMENFASSUNG	128

6	SUMMARY	129
7	LITERATUR	130
8	ANHANG	146

Abkürzungen

aa	<i>amino acid</i> (Aminosäure)
A. bidest.	<i>Aqua bidestillata</i> ; hier: entionisiertes und von organischen Bestandteilen befreites Wasser, MilliQ-Anlage (Millipore, Eschborn)
A. dest.	<i>Aqua destillata</i>
<i>A. th.</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
bIR	biotisch Induzierte Resistenz
BC	<i>backcross</i> (Rückkreuzung)
BCI	<i>barley chemically induced</i>
<i>Bgh</i>	<i>Blumeria graminis</i> f.sp. <i>hordei</i> (Echter Gerstenmehltau)
<i>Bgt</i>	<i>Blumeria graminis</i> f.sp. <i>tritici</i> (Echter Weizenmehltau)
bp	<i>base pair</i> (Basenpaar)
BSA	<i>bovine serum albumine</i> (Rinderserumalbumin)
BTH	Benzo(1,2,3)thiadiazol-7-carbothionsäure-S-methylester, Bion® (Ciba-Geigy, jetzt Syngenta, Basel, Schweiz)
CaMV	<i>Cauliflower Mosaik Virus</i>
cDNA	<i>copy-DNA</i> (aus [m]RNA synthetisierte DNA)
cIR	chemisch Induzierte Resistenz
cpm	<i>counts per minute</i> (gemessene radioaktive Zerfälle pro Minute)
cv.	<i>cultivar</i> (Sorte)
DCINA	<i>2,6-dichloroisonicotinic acid</i> (2,6-Dichlorisonikotinsäure, Ciba-Geigy, jetzt Syngenta, Basel, Schweiz)
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>2'-deoxyribonucleic acid</i> (2'-Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	2'-desoxy-Nukleosid-triphosphat (Zucker: 2'-Desoxyribose; dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
dpi	<i>days post inoculation</i> (Tage nach der Inokulation)
dpt	<i>days post treatment</i> (Tage nach der Behandlung)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESH	<i>elongating secondary hyphae</i> (Sekundärhyphe)
EtBr ⁻	Ethidiumbromid
f.sp.	<i>forma specialis</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i> , grün fluoreszierendes Protein
GUS	β -Glucuronidase
Hau	Haustorium
hpi	<i>hours post inoculation</i> (Stunden nach der Inokulation)
hpt	<i>hours post treatment</i> (Stunden nach der Behandlung)
HR	Hypersensitive Reaktion
IPAZ	Institut für Phytopathologie und Angewandte Zoologie
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktosid
IR	Induzierte Resistenz
IWF	interzelluläre Waschflüssigkeit
JA	Jasmonat
JIP	Jasmonat induziertes Protein

JLU	Justus-Liebig-Universität
JM	Jasmonsäuremethylester, Methyljasmonat
IIR	lokale Induzierte Resistenz
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MOPS	Morpholin-3-propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger RNA</i> (Boten-RNA)
NTP	Nukleosidtriphosphat (Zucker: Ribose; ATP, GTP, CTP, UTP)
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i> (offenes Leseraster)
Pap	Papille
PBST	<i>phosphate-buffered saline</i> and Tween
PDA	<i>potato-dextrose-agar</i> (Kartoffel-Glucose-Agar)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PR-Protein	<i>pathogenesis-related protein</i>
RACE	<i>rapid amplification of cDNA ends</i>
rcf	<i>relative centrifugal force</i> (relative Zentrifugalkraft)
RIP	ribosomeninaktivierendes Protein
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RNAi	<i>RNA interference</i>
ROI	<i>reactive oxygen intermediate</i> (reaktives Sauerstoffintermediat)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkriptase-PCR
SA	Salicylsäure
SAR	SA-abhängige Systemisch Induzierte Resistenz (<i>systemic acquired resistance</i>)
sIR	systemisch Induzierte Resistenz
SDS	<i>sodiumdodecylsulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SSH	suppressive Subtraktionshybridisierung
SSC	<i>sodium-salt-citrat</i> (Natriumchlorid und -citrat)
TBE	Tris-Borat-EDTA
u	<i>unit</i>
UV	ultraviolett
WP	<i>wettable powder</i> (Leerformulierung)

1 EINLEITUNG

Als Bestandteil der Phytomedizin befasst sich die Phytopathologie mit Pflanzenkrankheiten, die durch Viren, Bakterien und Pilze hervorgerufen werden, sowie mit Schädigungen, die durch abiotische Faktoren und den Befall mit parasitischen Blütenpflanzen entstehen können (Schlösser 1997). Das Auftreten von Krankheitssymptomen kann zum Ausfall der ganzen Pflanze oder zu einer verringerten Menge oder Qualität des Erntegutes führen. Der für acht Hauptnahrungspflanzen geschätzte weltweite Verlust der erreichbaren Produktion zwischen 1988-1990 liegt bei 13,3 % (Oerke *et al.* 1994). Um die Ertragsverluste durch Pflanzenkrankheiten auf einem wirtschaftlich vertretbaren Maß zu halten, sind Pflanzenschutzmaßnahmen unabdingbar. Für die Entwicklung neuer, nachhaltiger Konzepte ist ein detailliertes Grundlagenwissen über Wirt-Pathogen-Interaktionen und Resistenzmechanismen von Pflanzen gegenüber Krankheitserregern entscheidend.

1.1 WIRT-PATHOGEN-INTERAKTIONEN

Ist ein Mikroorganismus (Virus, Bakterium, Pilz) in der Lage, mit Hilfe von Pathogenitätsfaktoren eine Pflanze erfolgreich zu besiedeln und eine Schädigung hervorzurufen, so wird er als Pathogen, die befallene Pflanze als Wirt und die Beziehung als kompatibel (verträglich) bezeichnet (Schlösser 1997). Als Sonderfall kompatibler Interaktionen gilt die Toleranz von Pflanzen gegenüber Pathogenen, oftmals Viren (Agrios 1997). Dabei verursacht der Befall einer Pflanze keine starken Krankheitssymptome und keine deutliche Reduktion der Biomasse bzw. des Ertrages. Das Pathogen entwickelt und vermehrt sich jedoch in gleichem Maße wie in nicht-toleranten anfälligen Pflanzen.

Gelingt es einer Pflanze, den Angriff eines Pathogens abzuwehren, so dass der Erreger frühzeitig in seiner Entwicklung und Vermehrung gehemmt wird, kommt es zu keiner oder nur schwacher Ausprägung von Symptomen. Man spricht in diesem Fall von einer Resistenz des Wirtes und Inkompatibilität (Unverträglichkeit) der Wechselbeziehung mit dem avirulenten Pathogen (Schlösser 1997).

1.2 FORMEN DER RESISTENZ

Alle Pflanzen besitzen Abwehrmechanismen, die auf verschiedenen präformierten oder durch die Infektion ausgelösten physikalischen (strukturellen) und biochemischen Faktoren beruhen, und gegenüber den allermeisten Pathogenen Resistenz vermitteln (Heath 1991).

Diese unspezifisch wirkende Nicht-Wirt-Resistenz ist durch viele genetische Faktoren (poly- oder multigen) bedingt. Sie verleiht (allen Genotypen) einer Pflanzenart vollständige und dauerhafte Resistenz gegen alle Genotypen eines Pathogens.

Demgegenüber steht die Basiskompatibilität bzw. Wirt-Resistenz, bei der zwischen quantitativer (horizontaler) und qualitativer (vertikaler) Resistenz unterschieden werden kann (van der Plank 1984, Heath 2000). Bei der horizontalen Resistenz, die im allgemeinen wie die Nicht-Wirt-Resistenz unter komplexer genetischer Kontrolle steht, ist ein Genotyp einer Pflanzenart gegenüber zumindest einigen, wenn nicht allen Rassen eines Pathogens resistent (rassenunspezifisch). Dieser breit wirksame Schutz ist dauerhaft, meist jedoch nicht vollständig gegenüber den jeweiligen Pathotypen. Unter diese Form der Resistenz fallen möglicherweise auch organspezifische oder altersbedingte Resistenzen, über deren Wirkmechanismus bisher wenig bekannt ist (Schlösser 1997).

Es wird angenommen, dass in der Koevolution von Wirt und Pathogen die Nicht-Wirt-Resistenz von einigen Erregern durchbrochen werden konnte (Basiskompatibilität) und anschließend durch spezifische Mechanismen seitens der Pflanze wieder hergestellt wurde (Heath 1991). Dies konnte zur Ausbildung von vertikalen Resistenzen führen, die einem bestimmten Wirtsgenotyp vollständige Resistenz gegenüber einer physiologischen Rasse eines Pathogens verleihen. Diese Resistenzen sind Rassen-Sorten-spezifisch und lassen sich mit dem Gen-für-Gen Modell von Flor (1971) beschreiben. Zu jedem Wirtsgen, das Resistenz vermittelt, existiert auf Seiten des Pathogens ein korrespondierendes Avirulenzgen. Man geht davon aus, dass in einer anfälligen Pflanze (Basiskompatibilität) ein Gen zum Resistenzgen werden kann, indem sein Genprodukt mit einem Avirulenzgenprodukt des Pathogens interagiert (Heath 1991). Das Resistenzgenprodukt soll dabei als Rezeptor fungieren und das Produkt des Avirulenzgens (spezifischer Elicitor, Avr) binden (de Wit 1997). Diese spezifische Erkennung soll dann zur Auslösung verschiedener Abwehrmechanismen und damit zur Resistenz der Pflanze gegenüber diesem Pathotyp führen. Durch Veränderung des Avirulenzgenproduktes (avr) kann die Bindung durch den Rezeptor und damit die Erkennung des Pathogens jedoch verhindert werden. Die Auslösung von Abwehrmechanismen unterbleibt, so dass die Pflanze anfällig und das Pathogen virulent wird. In der pflanzenbaulichen Anwendung schwankt die Wirksamkeit von Resistenzgenen bis zum Auftreten eines Resistenzbruchs zwischen 3 und 10 Jahren (Schlösser 1997). Das Vorhandensein von Resistenzgenen in Pflanzen und von korrespondierenden Avirulenzgenen in Pathogenen wurde für verschiedene Pathosysteme (z.B. Tomate - *Fulvia* [syn. *Cladosporium*] *fulva*, Tomate - *Pseudomonas syringae*, Reis - *Magnaporthe grisea*, *Arabidopsis* - *Pseudomonas syringae*) bestätigt, die tatsächliche Bindung der jeweiligen Moleküle wurde jedoch erst kürzlich zum ersten Mal für die drei Systeme Tomate (Pto) - *P. syringae* (Avr-Pto), Reis (Pi-ta) - *M. grisea* (Avr-Pita) und *Arabidopsis* (RPS2)- *P. syringae* (Avr-RPT2) gezeigt (Bonas & van den Ackerveken 1999, Cohn *et al.* 2001, de Wit & Joosten 1999, Jia *et al.* 2000, Leister & Katagiri 2000). Diese

spezifische Resistenz einer Pflanzensorte gegenüber einer Rasse eines Pathogens ist jeweils durch ein Gen (monogene Resistenz) oder einige wenige Gene (oligogene Resistenz) bedingt (Agrios 1997, de Wit & Joosten 1999).

1.3 ABWEHRMECHANISMEN

Bei der pflanzlichen Abwehr von Pathogenen lassen sich präformierte und induzierte Mechanismen physikalischer oder biochemischer Natur unterscheiden.

Präformierte Komponenten der Abwehr sind bereits vor dem Angriff eines Pathogens in der Pflanze vorhanden. Dazu zählen als mechanische Barrieren z.B. die epicuticuläre Wachsschicht, die Cuticula, die Zellwand selber von Epidermis und Rhizodermis, sowie die strukturelle Beschaffenheit der Abschlussgewebe der Pflanze, bzw. das Fehlen bestimmter struktureller Erkennungsfaktoren (Agrios 1997, Schlösser 1997). Zu den biochemischen Komponenten der Abwehr gehören Enzyminhibitoren (z.B. Proteaseinhibitoren, Gerbstoffe, Phenole), kohlenhydratbindende Lectine, hydrolytische (Glucanasen, Chitinasen) oder inhibierende Proteine (RIPs, ribosomeninaktivierende Proteine; Defensine und Snakins, antimikrobiell wirksame Peptide in Speicher- und generativem Gewebe), sekundäre Metabolite wie Saponine, Senföle und andere Phytotoxine (Agrios 1997, Broekaert *et al.* 1995, Heath 2000, Schlösser 1997, Segura *et al.* 1999, Stirpe *et al.* 1992). Aber auch das Fehlen bestimmter für das Pathogen essentieller Substanzen, sowie von Rezeptoren für wirtsspezifische Toxine können zur Resistenz führen (Agrios 1997, Schlösser 1997).

Induzierte Abwehrmechanismen können ebenfalls physikalischer oder biochemischer Natur sein und werden durch den Kontakt eines Mikroorganismus mit der Pflanze ausgelöst. Vom Erreger abgegebene Substanzen (Glycoproteine, Kohlenhydrate, Fettsäuren, Peptide), sowie Abbauprodukte der Oberfläche des Pathogens oder der pflanzlichen Zellwand, die durch Einwirkung von Wirts- bzw. Erregersubstanzen entstehen können, sind potentielle Elicitoren (Auslöser). Dieser kann sowohl rassenspezifisch als auch rassenspezifisch sein und entsprechend zur horizontalen Resistenz bzw. resistenzgenvermittelten Resistenz (vertikale Resistenz, s.o.) führen (Heath 2000). Die Erkennung des Elicitors durch Bindung an einen pflanzlichen Rezeptor löst dabei über die Aktivierung einer Signaltransduktionskaskade verschiedene Abwehrmechanismen aus (Scheel 1998, Abb. 1.1). Zu den Komponenten der induzierten Abwehr gehören Veränderungen der Zellwand, die einer mechanischen Beanspruchung und der Aktivität lytischer Enzyme standhalten und damit das Eindringen des Pathogens verhindern. Dies wird durch Ablagerung von Zellwandbestandteilen, insbesondere Callose (poly- β -1,3-Glucan), Lignin, Suberin und basische hydroxyprolinreiche Glycoproteine, sowie deren Polymerisierung oder Vernetzung erreicht, aber auch durch Ablagerung gummiartiger

Verbindungen (Hammond-Kosack & Jones 1996, Agrios 1997). Die schnelle Bildung lokal eng begrenzter Zellwandappositionen (Papillen) verhindert insbesondere pilzlichen Hyphen den Zugang zur Zelle. Weitere im Bereich der Zellwand lokalisierte Komponenten wirken auf verschiedene Weise toxisch auf eindringende Mikroorganismen (Extensine, reaktive Sauerstoffintermediate [ROIs, *reactive oxygen intermediates*] wie H_2O_2 ; Hammond-Kosack & Jones 1996, Scheel 1998). Ein oft mit Zellwandmodifikationen assoziierter induzierter Abwehrmechanismus ist die Hypersensitive Reaktion (HR), die zum schnellen Absterben einzelner oder mehrerer Zellen an der Interaktionsstelle mit dem Pathogen führt (Hammond-Kosack & Jones 1996). Während obligat biotrophen Pathogenen, die für ihre Entwicklung auf intakte Zellen angewiesen sind, durch eine HR die Lebensgrundlage entzogen wird, können sich nekrotrophe Pathogene vom Material abgestorbener Zellen ernähren. Bei der zellulären Dekompartimentierung durch die HR werden jedoch möglicherweise antimikrobiell wirksame Substanzen aus der Vakuole freigesetzt, sowie phenolische Komponenten angereichert und polymerisiert, wodurch es zur Eingrenzung und Abtötung der Pathogene kommt (Hammond-Kosack & Jones 1996, Scheel 1998). Zusätzlich kann in den an die Interaktionsstelle angrenzenden Zellen eine Synthese von Phytoalexinen stattfinden. Diese niedermolekularen antimikrobiell wirksamen Substanzen verschiedener Stoffklassen, deren Beitrag zur Abwehr am stärksten gegenüber pilzlichen Pathogenen zu sein scheint, werden jedoch nicht in befallsfreie Pflanzenteile transportiert (Kuč 1995, Schlösser 1997). Des weiteren akkumulieren nach Infektion mit Viren, Bakterien und Pilzen oder Elicitorapplikation intra- und extrazellulär lokalisierte PR-Proteine und -Peptide (*pathogenesis-related proteins*) (Hammond-Kosack & Jones 1996). Zu dieser Gruppe von Proteinen gehören potentiell antimikrobiell wirksame, wie Glucanasen, Chitinasen, Proteasen und Proteaseinhibitoren, Peroxidasen, Lysozyme, Thionine, Defensine, RIPs und andere, in ihrer biochemischen Funktion unbekannte (Agrios 1997, Broekaert *et al.* 1995, Chaudhry *et al.* 1994). Mechanismen zur Detoxifizierung oder Metabolisierung speziell von Toxinen, die für manche Pathogene essentiell für eine erfolgreiche Infektion sind, tragen ebenfalls zur Abwehr von Pathogenen bei (Agrios 1997).

1.4 SIGNALMOLEKÜLE UND ELEMENTE VON SIGNALTRANSDUKTIONSKASKADEN

Als schnelle Reaktion nach der Erkennung eines Pathogens ist die Öffnung spezifischer Ionenkanäle, die zum Influx von Calciumionen und Protonen und zum Efflux von Kalium- und Chloridionen führen, zu beobachten (Scheel 1998). Die transiente Akkumulation von cytosolischen Ca^{2+} scheint eine Voraussetzung für die Bildung von ROIs wie Hydrogenperoxid, Superoxidanion und Hydroxylradikal durch eine membrangebundene

NAD(P)H-Oxidase und/oder apoplastisch lokalisierte Peroxidase zu sein (Blumwald *et al.* 1998, Scheel 1998, Somssich & Hahlbrock 1998). Der raschen Entstehung von ROIs, dem sogenannten *oxidative burst*, wird eine zentrale Rolle bei der Pathogenabwehr zugeschrieben, da ROIs direkt toxisch auf Mikroorganismen wirken können, als Katalysator von Vernetzungs- und Polymerisierungsreaktionen an der Verstärkung der Zellwand beteiligt sind und Signalkaskaden auslösen können, die zur HR, Phytoalexinsynthese und Aktivierung von Abwehrgenen führen (Doke *et al.* 1994, Scheel 1998). An den Signalkaskaden können G-Proteine (GTP-bindende Proteine), Proteinkinasen, Phosphatasen und Phospholipasen beteiligt sein (Blumwald *et al.* 1998, Scheel 1998, Luan 1998). Weitere Elemente von Signalketten der pflanzlichen Abwehr sind die Phytohormone Salicylat (SA), Jasmonat (JA) und Ethylen, bzw. deren Derivate, und Systemin (s.u.) (Enyedi *et al.* 1992a, Hammond-Kosack & Jones 1996, Scheel 1998). Die Abbildung 1.1 gibt einen Überblick über die ersten Reaktionen in Wirt-Pathogen-Interaktionen.

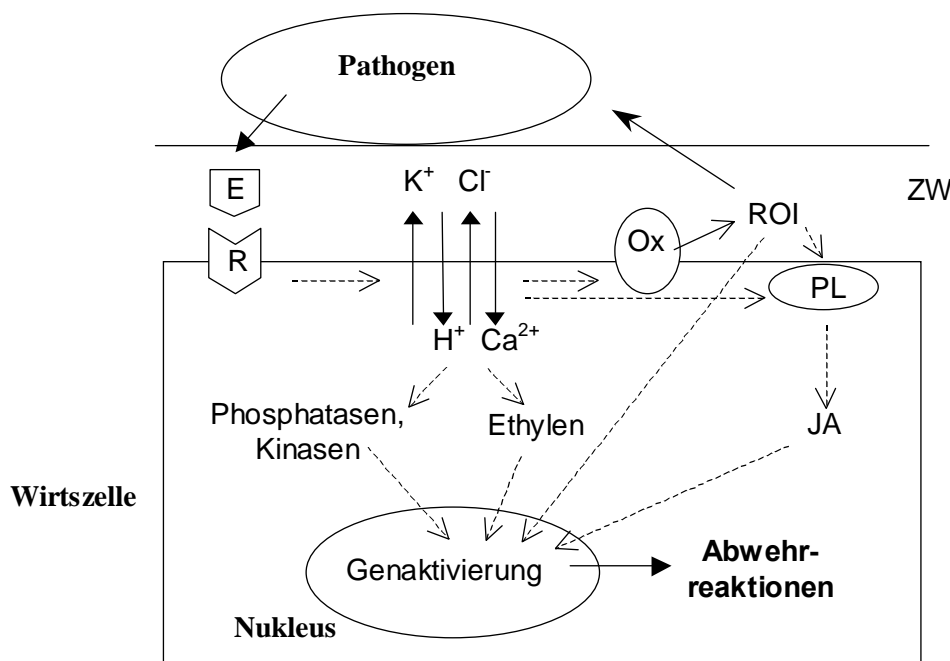


Abb. 1.1 Schematische Übersicht von Signalerkennung und ersten Reaktionen der Signaltransduktion in Wirt-Pathogen-Interaktionen.

Nach Erkennung eines Elicitors E (Rassen-Sorten-spezifisch oder unspezifisch) durch einen pflanzlichen Rezeptor R (Resistenzgenprodukt oder unspezifisch) werden als erste messbare Reaktionen Ionenflüsse durch die Plasmamembran und ein *oxidative burst* (ROI) beschrieben. Die Rezeptor-Elicitor-Erkennung kann extra- oder intrazellulär stattfinden, wobei in Rassen-Sorten-spezifischen Interaktionen Abwehrreaktionen schneller und effektiver ablaufen als bei unspezifischer Interaktion. Jasmonatsynthese (JA), möglicherweise über eine membrangebundene Phospholipase (PL) ausgelöst, Ethylensynthese, sowie die Aktivierung von Kinasen (u.a. MAP-Kinasen) und Phosphatasen gehören zu den frühen Elementen der Signalkette. Ox: NADPH-Oxidase oder andere Oxidasen; ZW: Zellwand. Verändert nach Hammond-Kosack & Jones 1996 und Somssich & Hahlbrock 1998.

1.5 INDUZIERTER RESISTENZ

Dem Phänomen der Induzierten Resistenz (IR) liegt ein natürlicher Mechanismus zu Grunde, der durch pathogene oder apathogene Mikroorganismen sowie Herbivore ausgelöst werden kann und zu einer erhöhten Resistenz gegenüber Pathogenen bzw. Insekten führt (bIR, biotisch Induzierte Resistenz, Hammerschmidt 1993, van Loon *et al.* 1998). Es handelt sich bei der IR um einen aktiven pflanzlichen Prozess, der sowohl die Auslösung und Verstärkung zellulärer Abwehrmechanismen (s.o.) durch einen Induktor umfasst, als auch die erhöhte Bereitschaft der Pflanze beinhaltet, schneller mit Abwehrreaktionen auf den Angriff zu antworten (Hammerschmidt 1993). Dieser Zustand erhöhter Abwehrbereitschaft wird auch Sensibilisierung (*sensitizing*) oder *priming* genannt (Conrath *et al.* 2001). Im Gegensatz zur resistenzgenvermittelten Resistenz (s.o.) wirkt die IR rassenunspezifisch und vermittelt einen quantitativen Schutz gegenüber einem breiten Spektrum verschiedener Pathogene (Viren, Bakterien, Pilze) und Schädlinge, der einige Tage, Wochen und sogar Monate andauern kann (Hammerschmidt 1993, Schneider *et al.* 1996).

Anfang des 20. Jahrhunderts wurde beobachtet, dass die Vorbehandlung einer Pflanze mit pathogenen Mikroorganismen zum erhöhten Schutz gegenüber einer nachfolgenden Infektion mit denselben oder anderen virulenten Pathogenen führte (zitiert in Kessmann *et al.* 1994). Erste exakte Versuche gingen dann von Ross (1961) aus, der die Begriffe *local* und *systemic acquired resistance* (lokale und systemische erworbene Resistenz, treffender ist jedoch der Ausdruck induzierte Resistenz, daher: IIR bzw. sIR) prägte. Bei der IIR bleibt der Effekt auf das mit dem Induktor-Pathogen inokulierte Blatt beschränkt, bei der sIR weitet sich die Resistenz auf unbehandelte Pflanzenteile wie höhere Blattetagen, den Zuwachs oder auch Wurzeln (Gessler & Kuć 1982) aus.

Auf den Versuchen von Ross (1961) aufbauend, wurde das Phänomen der sIR in verschiedenen Dikotyledonen wie Tabak und Gurke sehr gut charakterisiert und konnte auch in *Arabidopsis thaliana*, der experimentellen Modellpflanze, nachgewiesen werden (Kessmann *et al.* 1994). Die Ausprägung der sIR ist mit der Expression eines komplexen Sets von Genen assoziiert, zu denen PR-Gene und solche unbekannter Funktion gehören (Ward *et al.* 1991, Uknes *et al.* 1992, Ryals *et al.* 1996). Ihre Expression variiert jedoch in Quantität und Qualität zwischen verschiedenen Pflanzenarten und Induktoren (Ryals *et al.* 1996, Thomma *et al.* 1998, Thomma *et al.* 2001, Bostock 1999).

Eine Form der sIR ist durch die Akkumulation von Salicylsäure (SA) charakterisiert, die sowohl lokal am Ort der Infektion, als auch systemisch in distal gelegenen Gewebe z.T. durch den Transport im Phloem, beobachtet wird (SAR, Schneider *et al.* 1996). Dabei korreliert der endogene SA-Gehalt mit der Induktion von PR-Proteinen und der Resistenz (Enyedi *et al.* 1992b, Yalpani *et al.* 1993). Auch die exogene Applikation von SA kann sowohl Resistenz als auch ein gleiches Set von SAR-Genen wie nach Pathogenbefall induzieren (Ward *et al.* 1991). Transgene Tabak- und *Arabidopsis*-Pflanzen, in denen die

Akkumulation von SA unterbunden ist, können nach Pathogenbefall keine SA akkumulieren, zeigen keine SAR-Genexpression und keine SAR gegenüber Viren, Bakterien und Pilzen (Delaney *et al.* 1994, Gaffney *et al.* 1993). Die Überexpression einer SA-Hydroxylase von *Pseudomonas putida*, die in den Naphthalenmetabolismus involviert ist (*NahG*), führt in diesen transgenen Pflanzen zur Umwandlung von SA in das SAR-inaktive Catechol. Andererseits zeigen transgene Tabakpflanzen, die eine konstitutiv erhöhte SA-Biosynthese aufweisen (*CSA*, *constitutive SA biosynthesis*), auch eine konstitutive Expression von SAR-Genen und eine erhöhte Resistenz gegenüber Viren und Pilzen (Verberne *et al.* 2000). Die Überexpression zweier bakterieller Gene, die Chorismat in SA überführen, resultierte dabei in einem bis tausendfach erhöhten SA-Gehalt. Das translozierte Signal zur Auslösung der SAR in distalen Pflanzenteilen scheint jedoch ein anderes als SA zu sein. Rasmussen und Mitarbeiter (1991) konnten zeigen, dass die Entnahme eines infizierten Blattes vor einer detektierbaren Akkumulation von SA die systemische Expression von SAR-Genen nicht beeinflusst. Pfropfungsexperimente mit *NahG* Pflanzen bestätigten die Beobachtung, da transgene Wurzelstöcke in aufgepfropften Pflanzenteilen SAR induzieren können (Vernooij *et al.* 1994). Andererseits sind jedoch *NahG*-Pfropfstöcke unfähig eine Resistenz aufzubauen, unabhängig vom verwendeten Wurzelstock (Vernooij *et al.* 1994). Diese Experimente belegen, dass SA ein notwendiges Element für die SAR-Signaltransduktion und für die Induktion der SAR-Genexpression ist, wahrscheinlich jedoch nicht das eigentlich in distale Pflanzenteile translozierte Signal darstellt und dass die Synthese des systemischen Signals unabhängig von einer SA-Akkumulation erfolgen kann. Die Natur des systemischen Signals zur Etablierung der SAR ist bislang nicht identifiziert.

Neben dieser beschriebenen SA-abhängigen Form gibt es auch SA-unabhängige Formen der sIR. Als Beispiele seien hier die wundinduzierte und die durch apathogene Rhizobakterien induzierte systemische Resistenz genannt (Maleck & Dietrich 1999, Pieterse & van Loon 1999, Thomma *et al.* 2001). Gemeinsames Kriterium dieser SA-unabhängigen Signalwege ist die Abhängigkeit von den Phytohormonen Jasmonat (JA) und Ethylen (Maleck & Dietrich 1999, Pieterse & van Loon 1999). In dem wundinduzierten Signalweg, der oft mit der Resistenz gegenüber Insekten gleichgesetzt wird, wirken JA und Ethylen synergistisch auf die Expression typischer Abwehrgene und stimulieren wechselseitig ihre Biosynthese (Maleck & Dietrich 1999). In Tomate spielt zusätzlich Systemin, ein Peptid mit hormonähnlicher regulatorischer Funktion, eine Rolle (Enyedi *et al.* 1992a, Ryan 2000). Zu den typischen wund- oder insekteninduzierten Genen gehören solche für Proteinaseinhibitoren, Thionine und Defensine, die auch durch einige Pathogene induziert werden können (Maleck & Dietrich 1999, Thomma *et al.* 2001, Bostock 1999). Die Tatsache, dass es nach Pathogenbefall ebenfalls zu einer Akkumulation von JA und Ethylen kommt und die exogene Applikation von Methyljasmonat (JM) Resistenz gegen einige Pathogene induzieren kann, die nicht

durch den SA-Signalweg kontrolliert werden, spricht für eine Beteiligung dieser Phytohormone auch an der Pathogenabwehr (Bostock 1999, Creelmann & Mullet 1997a, Penninckx *et al.* 1996, Pieterse & van Loon 1999, Thomma *et al.* 1998). Apathogene wurzelbesiedelnde Rhizobakterien vermitteln Resistenz ohne die Expression der klassischen PR-Gene zu induzieren (van Loon *et al.* 1998, Hoffland *et al.* 1995). Die SA-abhängigen und SA-unabhängigen Signalwege der sIR sind schematisch in Abbildung 1.2 dargestellt.

Nahezu alle Erkenntnisse über die Induzierte Resistenz sind in dikotylen Pflanzen gewonnen und lassen sich nicht ohne weiteres auf die Wirt-Pathogen-Interaktionen monokotyler Pflanzen übertragen. Eine systemische Resistenzinduktion durch Mikroorganismen wurde in letzteren nur in wenigen Untersuchungen nachgewiesen, wobei eine unabhängige Reproduktion der Ergebnisse bisher nicht gezeigt werden konnte. In Reis wurde sIR gegenüber *Magnaporthe oryzae*, dem Erreger des Reisbrenner, durch *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* beobachtet, die wahrscheinlich nicht auf eine SA-Akkumulation zurückzuführen ist (Smith & Métraux 1991). Eine systemische wundinduzierte Resistenz gegenüber *Magnaporthe* ohne systemische Induktion der PR-Genexpression ging mit einer transienten JA-Akkumulation einher (Schweizer *et al.* 1998). In Gerste wurden meistens nur lokale Effekte einer Resistenzinduktion beschrieben, z.B. gegenüber Echtem Gerstenmehltau mit virulenten und avirulenten *Blumeria graminis*-Isolaten (Cho & Smedegård-Petersen 1986, Thordal-Christensen & Smedegård-Petersen 1988). Die Induktion der Expression verschiedener PR-Gene wurde in Gerste in kompatiblen und inkompatiblen Interaktionen mit dem Echten Gerstenmehltaupilz gezeigt (Boyd *et al.* 1994, Gregersen *et al.* 1997). Auch gegen *Pyrenophora teres*, dem Erreger der Netzfleckenkrankheit an Gerste, konnte mit den Nicht-Wirt-Pathogenen *Bipolaris maydis* und *Septoria nodorum* lokal Resistenz induziert werden (Jørgensen *et al.* 1998). Dabei wurde neben Papillenbildung und HR die Expression einiger PR-Gene beschrieben. Hwang & Heitefuss (1982) konnten systemische Effekte gegenüber Echtem Gerstenmehltau beobachten, verwendeten zur Induktor-Inokulation jedoch eine Sporensuspension desselben Pilzes unter Zusatz eines Öles. Sarhan *et al.* (1991) wiesen sIR an Gerste durch Präinokulation mit *Cochliobolus sativus* gegenüber demselben Pathogen nach. Die systemische rhizobakterieninduzierte Resistenz hingegen wurde bislang für keine Monokotyle beschrieben (van Loon *et al.* 1998).

1.5.1 Chemisch Induzierte Resistenz

Eine Vielzahl natürlich vorkommender und synthetischer Substanzen wurden auf eine resistenzinduzierende Wirkung untersucht. Kriterien für einen Induktor sind dabei (1) eine geringe oder keine direkte toxische Wirkung auf das Pathogen, (2) die Aktivierung von

pflanzlichen Abwehrmechanismen, die zur Resistenz führen, und (3) eine möglichst breite Wirksamkeit gegenüber verschiedenen Pathogenen (Schneider *et al.* 1996).

Zu den natürlich vorkommenden chemischen Induktoren gehören anorganische Phosphatsalze, für die in verschiedenen di- und monokotylen Pflanzen eine resistenzinduzierende Wirkung nachgewiesen wurde, bei der eine eingeschränkte Ca^{2+} -Verfügbarkeit als Auslöser für die Synthese eines endogenen Signals diskutiert wird (Schneider *et al.* 1996). Verschiedene Elicitemoleküle (z.B. Arachidonsäure, Chitosan), cytotoxische Elicite, die Nekrosen induzieren können (z.B. Cryptogein), ein unbekannter Wirkstoff aus dem Kulturfiltrat eines *Bacillus subtilis*-Stammes ("B50"), für den eine gute Wirksamkeit in einer Reihe von Wirt-Pathogen-Systemen mit Falschen und Echten Mehltäupilzen, sowie Rostpilzen beschrieben wurde, und die Phytohormone Ethylen, JA und SA (s.o.; Abb. 1.2) sind weitere natürliche Induktorsubstanzen (Schneider *et al.* 1996, Steiner *et al.* 1988). SA wurde aufgrund des schmalen Grades zwischen Wirksamkeit und Auftreten von Phytotoxizität nicht für eine praktische Anwendung in Betracht gezogen (Kessmann *et al.* 1994). Allerdings wurden synthetische Substanzen entwickelt, die als Analoga von SA wirken, wie z.B. 2,6-Dichlorisonikotinsäure (DCINA) und Benzo(1,2,3)-thiadiazolcarbothionsäure-S-methylester (BTH, auch Azibenzolar-S-methyl; s. Abb. 1.2). BTH ist für die Anwendung im Anbau von Weizen, Reis, Bananen, Gemüse und Tabak als Pflanzenstärkungsmittel angemeldet und kommerziell erhältlich (Roberts & Hutson 1999). Beide Induktoren, DCINA und BTH, wirken sowohl in dikotylen als auch monokotylen Pflanzen, wobei sie in dikotylen Resistenz gegen das gleiche Pathogenspektrum wie die SA-abhängige SAR (Viren, Bakterien, Pilze) sowie die Expression der gleichen SAR-Gene induzieren (Friedrich *et al.* 1996, Lawton *et al.* 1996, Métraux *et al.* 1991, Ward *et al.* 1991). Dabei greifen sie vermutlich an der gleichen Stelle oder *downstream* von SA in die SAR-Signalkette ein, da durch DCINA- oder BTH-Applikation der endogene SA-Gehalt unverändert bleibt, SAR in *NahG*-Pflanzen induziert werden kann und die Aktivierung in *nimI*-Mutanten (s.u.) durch keine der drei Chemikalien ausgelöst wird (Ryals *et al.* 1996). In Monokotylen (Weizen, Gerste, Mais und Reis) dagegen ist eine Wirkung nur gegenüber Pilzen beschrieben (Görlach *et al.* 1996, Kogel *et al.* 1994, Morris *et al.* 1998, Schweizer *et al.* 1997). Für die Aminosäure β -Aminobuttersäure (BABA), die nicht als Bestandteil von Proteinen vorkommt, ist in einigen Wirt-Pathogen-Interaktionen ausschließlich dikotyler Pflanzen die Kontrolle von Krankheiten beschrieben. Dabei sind die Beteiligung bei den Wirt-Pathogen-Interaktionen unter natürlichen Bedingungen sowie der genaue Wirkmechanismus unbekannt (Schneider *et al.* 1996, Siegrist *et al.* 2000). BABA wird systemisch in der Pflanze transportiert, kann natürliche Abwehrmechanismen aktivieren, die Synthese von PR-Proteinen induzieren und einen für die SA-abhängige SAR beschriebenen *priming*-Effekt auslösen (Hwang *et al.* 1997, Schneider *et al.* 1996, Siegrist *et al.* 2000, Zimmerli *et al.* 2000). In Tabak wurde die resistenzinduzierende Wirkung von BABA gegen TMV als Folge der Bildung nekrotischer Läsionen und der damit

verbundenen Auslösung des SA-abhängigen SAR-Signalweges diskutiert (Siegrist *et al.* 2000, s.u.). Dagegen konnten Zimmerli *et al.* (2000) in *Arabidopsis* bei der Resistenzinduktion gegen *Peronospora parasitica* keine Abhängigkeit von SA- und Pr-Genakkumulation oder JA- und Ethylenperzeption feststellen.

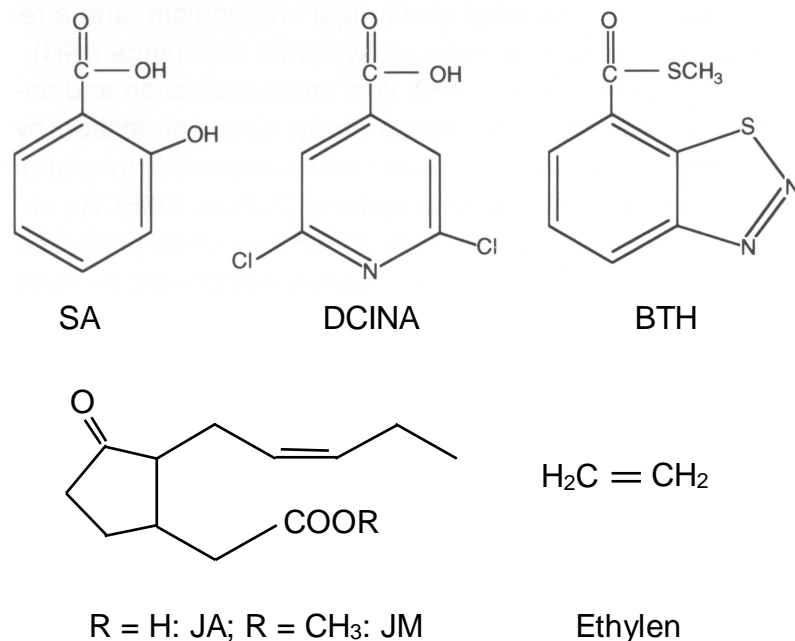


Abb. 1.2 Strukturformeln der Phytohormone Salicylsäure (SA), Jasmonsäure (JA), Methyljasmonat (JM) und Ethylen, sowie der synthetischen Resistenzinduktoren 2,6-Dichlorisonikotinsäure (DCINA) und Benzo(1,2,3)-thiadiazolcarbothionsäure-S-methylester (BTH).

1.5.2 Signalkaskaden der SAR

Die Verfügbarkeit einer Vielzahl von *Arabidopsis*-Mutanten, die in ihrer Reaktion auf Pathogene und die Ausprägung einer IR, Regulation der HR oder in SA-, JA- oder ethylenabhängigen Signaltransduktionswegen defekt sind, wurden und werden weiterhin zur Identifizierung von regulatorischen oder Signaltransduktionselementen der Induzierten Resistenz genutzt (Delaney 1997, 2000). Da die Auslösung der SAR durch ein Pathogen meistens mit einer Hypersensitiven Reaktion (HR) einhergeht, wurde der Zusammenhang von Zelltod und SAR untersucht (Ryals *et al.* 1996). *Arabidopsis*-Mutanten, die spontane Zelltodreaktionen ausführen (*lsd1-lsd7*, *lesions simulating disease*, *acd2*, *accelerated cell death*, *cpr5*, *constitutive expresser of PR genes*), zeigen verstärkte SAR-Genexpression, erhöhte SA-Gehalte und eine erhöhte Resistenz gegenüber Pathogenen (Bowling *et al.* 1997, Ryals *et al.* 1996). Die Ausprägung der Läsionen war dabei im Gegensatz zu SAR-Status und -Genexpression in einigen Mutanten (*lsd2*, *lsd4*) nicht von einer SA-

Akkumulation abhängig (Hunt *et al.* 1997). Das deutet darauf hin, dass die HR der an der Ausprägung der Resistenz beteiligten SA-Akkumulation vorangeht. Andere Mutanten, die erhöhte SA-Gehalte und konstitutive SAR-Genexpression ohne Zelltodreaktionen bei gleichzeitiger Resistenz zeigen (*cim*, *constitutive immunity*; *cpr1*, s.o.), repräsentieren möglicherweise Elemente der Signalkette *downstream* der HR (Bowling *et al.* 1997, Ryals *et al.* 1996). Andererseits wurden Mutanten identifiziert, die keine SA-abhängige SAR ausprägen können, d.h. erhöhte Anfälligkeit gegenüber Pathogenen zeigen, in ihrer SAR-Genexpression beeinträchtigt und nicht chemisch induzierbar sind (*npr1/nim1*, *nonexpresser of PR genes /noninducible immunity*) (Cao *et al.* 1994, Delaney *et al.* 1995). Das NPR1/NIM1-Protein enthält ankrynreiche Motive, die Protein-Protein-Interaktionen vermitteln können, und interagiert mit TGA-Transkriptionsfaktoren (Cao *et al.* 1997, Després *et al.* 2000, Ryals *et al.* 1997, Zhang *et al.* 1999). Die Überexpression von *Npr1/Nim1* führt nach einer Induktion (chemisch oder biotisch) zu erhöhter Resistenz und zur Akkumulation von PR-Proteinen (Cao *et al.* 1998). Interessanterweise ist die rhizobakterieninduzierte Resistenz ebenfalls abhängig von NPR1/NIM1, wird jedoch zusätzlich von Elementen der JA- (*Jar1*) und Ethylensignaltransduktionswege (*Etr1*) kontrolliert (Pieterse *et al.* 1998).

Klessig und Mitarbeiter konnten zwei MAP-Kinasen identifizieren, die in Abhängigkeit von einer pathogen- und verwundungsbedingten Resistenzantwort aktiviert wurden (Kumar & Klessig 2000). Die Transkriptakkumulation der einen MAP-Kinase konnte durch SA, nicht jedoch durch JA oder Ethylen induziert werden (SIPK, *salicylic acid-induced protein kinase*), wohingegen die Akkumulation der anderen durch Verwundung, jedoch weder durch SA, noch JA oder Ethylen induziert wurde (WIPK, *wounding-induced protein kinase*). Zusätzlich wurde eine MAP-Kinase-Kinase identifiziert, die spezifisch mit der SIPK interagiert (SIPKK, *SIPK kinase*) (Liu *et al.* 2000).

Diese und andere Untersuchungen verdeutlichen, dass verschiedene Signalwege an induzierten Resistenzreaktionen beteiligt sein können, und sowohl parallel verlaufen, sich überkreuzen oder potenzieren können (Feys and Parker 2000). Für eine wechselseitige Inhibition der SA- und JA-/Ethylensignalwege gibt es verschiedenste Hinweise, wobei SA möglicherweise die Schalterfunktion übernimmt (Felton *et al.* 1999, Gupta *et al.* 2000, Maleck & Dietrich 1999, Petersen *et al.* 2000; Abb. 1.3). Additive oder synergistische Effekte sind von Ethylen und JA auf die PR-Genexpression oder SA-abhängige SAR beschrieben (Lawton *et al.* 1994, Xu *et al.* 1994). Das Saugen von Blattläusen an Blättern von *Arabidopsis* führte zur Expression von Elementen JA- und SA-responsiver Signalwege (Moran & Thompson 2001) und die gleichzeitige Aktivierung von SA-abhängiger SAR und JA- und ethylenabhängiger rhizobakterieninduzierter Resistenz führte in *Arabidopsis* zu einem additiven Effekt auf die resistenzinduzierende Wirkung gegenüber *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (van Wees *et al.* 2000).

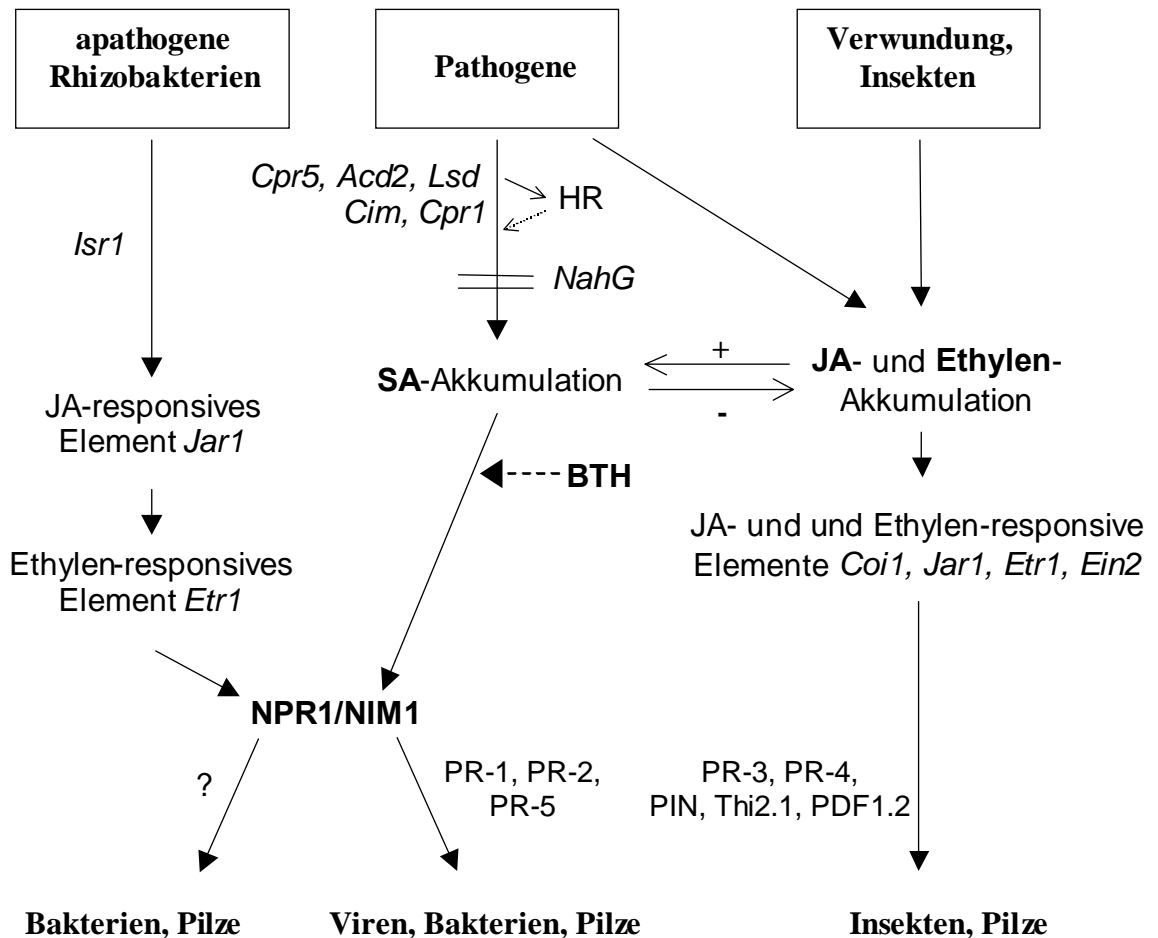


Abb. 1.3 Modell SA-abhängiger und SA-unabhängiger systemisch induzierbarer Signalwege in *Arabidopsis thaliana*.

Die rhizobakterienvermittelte Resistenz gegenüber Bakterien und Pilzen verläuft über Elemente der JA- (*Jar1*) und Ethylensignaltransduktion (*Etr1*), hängt jedoch von *Isr1* und *NPR1/NIM1*, einem Regulator der SA-abhängigen pathogeninduzierten Resistenz, ab. Die effektiven Abwehrkomponenten sind bisher unbekannt (?). Im Signalweg der pathogeninduzierten Resistenz sind verschiedene Elemente beschrieben (*Cim, Cpr1, Cpr5, Acd2, Lsd, NPR1/NIM1*), die ebenso wie eine SA-Akkumulation für die Resistenzinduktion gegenüber Viren, Bakterien und Pilzen notwendig sind. *BTH* (ebenso *DCINA*) greift an der gleichen Stelle wie SA oder *downstream* von SA in die Signalkette ein. Als Marker für diese Resistenzform gelten PR-1 (unbekannte Funktion), PR-2 (Glucanase) und PR-5 (thaumatinähnliches Protein). Verwundung, Insektenbefall und auch Pathogenbefall lösen einen JA- und ethylenabhängigen Signalweg aus, der sowohl die Akkumulation der Phytohormone, als auch bestimmte Signalkettenelemente (*Coil, Jar1, Etr1, Ein2*) benötigt. Die Ausprägung der Resistenz gegenüber Insekten und Pilzen wird von der Akkumulation der Proteine PR-3 (Chitinase), PR-4 (heveinähnliches Protein), Proteinaseinhibitor (PIN), Thionin (Thi2.1) und Defensin (PDF1.2) begleitet. Während SA einen inhibierenden Effekt (-) auf den JA-Signalweg und die JA-Synthese ausübt, kann der JA-abhängige Weg den SA-abhängigen fördern (+). Eine HR kann bei der Auslösung beider Signalwege eine Rolle spielen. Verändert nach: Pieterse & van Loon 1998, Bowling *et al.* 1997, Ryals *et al.* 1996 und Thomma *et al.* 2001.

1.6 DAS PATHOSYSTEM GERSTE - ECHTER GERSTENMEHLTAU

Die monokotyle Gerste (*Hordeum vulgare* L.) gehört zur Familie der Süßgräser (*Poaceae*) und wird weltweit hauptsächlich in gemäßigten Klimazonen angebaut. Sie wird als Nahrungsmittel (Brot, Graupen und Grütze), Futtermittel (Geflügel- und Schweinemast), sowie als Braugerste verwendet (Franke 1989).

Der Echte Mehltau an Getreide ist weltweit verbreitet und tritt hauptsächlich in den gemäßigten, feucht/trocken wechselnden Klimazonen auf. Ertragsverluste durch Echten Mehltau können in einzelnen Fällen 30 % übersteigen, wobei die Getreidearten Weizen und Gerste besonders gefährdet sind (Hoffmann & Schmutterer 1999). Der Erreger des Echten Mehltaus an Getreide (*Blumeria* [syn. *Erysiphe*] *graminis*) gehört zu den Ascomyceten (Eumycota) und ist als obligat biotrophes Pathogen auf lebende Wirtszellen angewiesen (Gäumann 1926, Ellingboe 1972). Er wächst nur auf der Blattoberfläche und nimmt mit Hilfe eines sogenannten Haustoriums, das in der intakten Epidermiszelle des Wirtes unter Einstülpung der Plasmamembran ausgebildet wird und von einer extrahaustorialen Matrix umgeben ist, Nährstoffe auf, die das Wachstum und die Vollendung des Lebenszyklus ermöglichen (Bushnell & Gay, 1978, Kauss 1990). Der vegetative Entwicklungszyklus beginnt mit dem Auskeimen einer Konidie durch die Ausbildung des primären Keimschlauches, der hauptsächlich der Fixierung auf der Blattoberfläche und der Wasseraufnahme dient. Der anschließend gebildete sekundäre oder appressoriale Keimschlauch verdickt sich an seinem Ende zu einem Appressorium, über das der Pilz einen Penetrationskeil durch die Zellwand treibt, um das Haustorium in der Zelle auszubilden. Ist die Zelle anfällig und sind ihre Abwehrmechanismen nicht effektiv, so gelingt dem Pilz die Etablierung eines vollständigen fingerförmigen Haustoriums nach 30 bis 40 Stunden. Dabei bildet der Pilz verlängerte Sekundärhyphen aus, mit denen er sich auf der Blattoberfläche ausbreitet. Nach Verzweigung der Sekundärhyphen werden sekundäre Haustorien in weitere Epidermiszellen gesenkt. Nach 4-8 Tagen werden im Mycel dicht nebeneinander Sporenträger auf der Blattoberfläche gebildet, an denen Konidienketten in die Luft ragen (Abb. 1.4 A). Das führt zur sogenannten Pustelbildung einzelner Sporenkolonien, die bei starkem Befall als mehliges Belag über das gesamte Assimilationsgewebe verteilt sind (Abb. 1.4 B). Die reifen Konidien werden durch den Wind verbreitet und können neue Infektionen auslösen. In alternden Mycelien (haploid) und mit zunehmender Seneszenz des Pflanzengewebes entstehen Sexualorgane (Antheridien, Ascogonien). Das befruchtete Ascogonium wächst mit dem sogenannten Hakenmycel (dikaryotisch) zu einem Fruchtkörper (Cleistothecium) aus, der aus einem Geflecht zusammengewachsener Hyphen besteht (Abb. 1.4 B). Die reifen Cleistothecien enthalten bis zu 25 Asci (diploid) mit jeweils acht Ascosporen (haploid), die bei Nässe aktiv herausgeschleudert werden. (Ellingboe 1972, Gäumann 1926, Hoffmann & Schmutterer 1999).

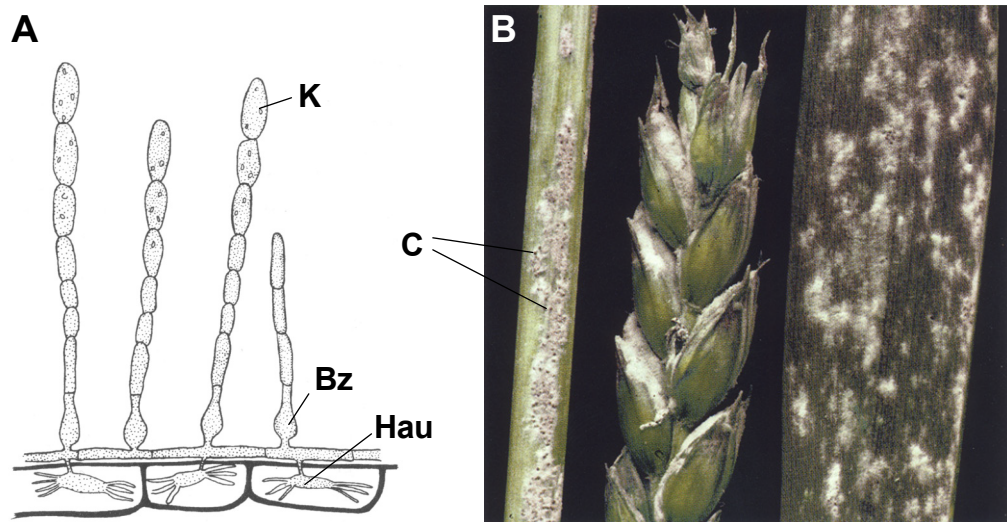


Abb. 1.4 *Blumeria graminis*.

A Schematische Darstellung erfolgreich penetrierter Epidermiszellen mit fingerförmig ausgebildeten Haustorien (Hau). An Sporenträgern mit keuliger Basalzelle (Bz) entstehen Sporenketten mit 8-10 Konidien (K). B Befall mit Echtem Mehltau an Stengel, Ähre und Blatt einer Weizenpflanze. Mycel mit schwarzen, kugeligen Cleistothecien (C). Entnommen aus: Hoffmann & Schmutterer 1999.

In Gerste sind eine Vielzahl von Resistenzgenen charakterisiert, deren Produkte die Avirulenzgenprodukte bestimmter Pathotypen des Echten Gerstenmehltaupilzes (*Blumeria graminis* f.sp. *hordei* Speer, *Bgh*) erkennen sollen, wodurch eine effektive Abwehr gegen das Pathogen ausgelöst wird (Rassen-Sorten-spezifische Resistenz, s.o.). Zu diesen Resistenzgenen gehören *Mla12* und *Mlg*, die in dieser Arbeit in verschiedenen Rückkreuzungslinien (*backcross lines*) verwendet wurden (Jørgensen 1994). Beide Genotypen vermitteln Resistenz gegenüber *Bgh* der Rasse A6. Die durch das semidominante *Mlg*-Gen vermittelte Resistenz löst als Abwehrmechanismen die Bildung einer effektiven Papille unterhalb der Penetrationsstelle aus, größtenteils gefolgt von einer HR (Görg *et al.* 1993, Schiffer *et al.* 1997). Das dominante *Mla12*-Gen bedingt eine Resistenz, die auf der Ausbildung einer HR nach erfolgter Penetration der Zelle beruht (Görg *et al.* 1993, Freialdenhoven *et al.* 1994, Schiffer *et al.* 1997). Eine weitere monogen bedingte Form der Resistenz wird durch das rezessive *mlo*-Gen vermittelt (Büschges *et al.* 1997). Die Resistenz folgt nicht dem Gen-für-Gen Konzept und wirkt vollständig (mit Ausnahme der Stomata-Nebenzellen) gegen alle natürlich vorkommenden europäischen Rassen des Echten Gerstenmehltaupilzes (rassenunspezifisch) durch Bildung effektiver Papillen (Jørgensen 1992, 1994). Die *mlo*-Resistenz kann spontan (hauptsächlich in äthiopischen Landrassen beobachtet) oder im Labor durch Mutation (*loss of function*) hervorgerufen werden und wird aufgrund spontaner Papillenbildung und Zelltodreaktionen als Ausfall eines negativen Regulators von Resistenzreaktionen diskutiert (Jørgensen 1992,

1994, Wolter *et al.* 1993, Peterhänsel *et al.* 1997). Eine schematische Übersicht über die verschiedenen Interaktionstypen der beschriebenen resistenzgenvermittelten Abwehr ist in Abbildung 1.5 dargestellt.

Nach der durch ein Resistenzgen vermittelten Erkennung des Pathogens werden entsprechende Abwehrmechanismen in der Pflanze aktiviert, die dann zur Resistenz führen (s.o.). Für einige resistenzgenvermittelten Resistenzen sind bestimmte Gene beschrieben, die zusätzlich zum Resistenzgen für die Funktion der Resistenz benötigt werden (Hammond-Kosack & Jones 1996). Diese *Rdr*-Gene (*required for disease resistance*) kodieren für Elemente der Signaltransduktion oder des entsprechenden Abwehrmechanismus, der durch die Resistenzgenfunktion ausgelöst wird. Für die *Mla12*- und die *mlo5*-vermittelte Resistenz sind jeweils zwei unabhängige Loci solcher Gene bekannt (*Rar1* und *Rar2*, *required for Mla12-specified resistance*; *Ror1* und *Ror2*, *required for mlo-specified resistance*) (Freialdenhoven *et al.* 1994, 1996, Torp & Jørgensen 1986). Die Mutation dieser Loci in *Mla12*- bzw. *mlo5*-resistenten Gerstenpflanzen führt jeweils zu partieller oder vollständiger Suszeptibilität.

In inkompatiblen Interaktionen von resistenten Gerstenlinien (*Mlg*, *Mla12*, *mlo5*) mit dem avirulenten Echten Mehltaupilz konnte kein Anstieg des SA-Gehaltes in inokulierten Blättern beobachtet werden (Hückelhoven *et al.* 1999). Trotzdem sind die chemischen Resistenzinduktoren der SA-abhängigen SAR (SA, DCINA) im Gerste - *Bgh*-Pathosystem wirksam (Kogel *et al.* 1994). Da in dieser chemisch Induzierten Resistenz (cIR) die gleichen Abwehrmechanismen wirksam sind, die bei resistengenbedingter Resistenz auftreten, wurde die cIR auch als Phänokopie der *Mlg*-vermittelten Resistenz bezeichnet (Kogel *et al.* 1994, Abb. 1.5). Die erfolgreiche Abwehr von *Bgh* ist mit einer lokalisierten H₂O₂-Akkumulation in Papillen oder attackierten Zellen verknüpft, sei es bei resistenzgenbedingter als auch bei der chemisch Induzierten Resistenz (Hückelhoven *et al.* 1999). Eine systemische bIR konnte jedoch bislang im System Gerste - Echter Gerstenmehltau nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden.

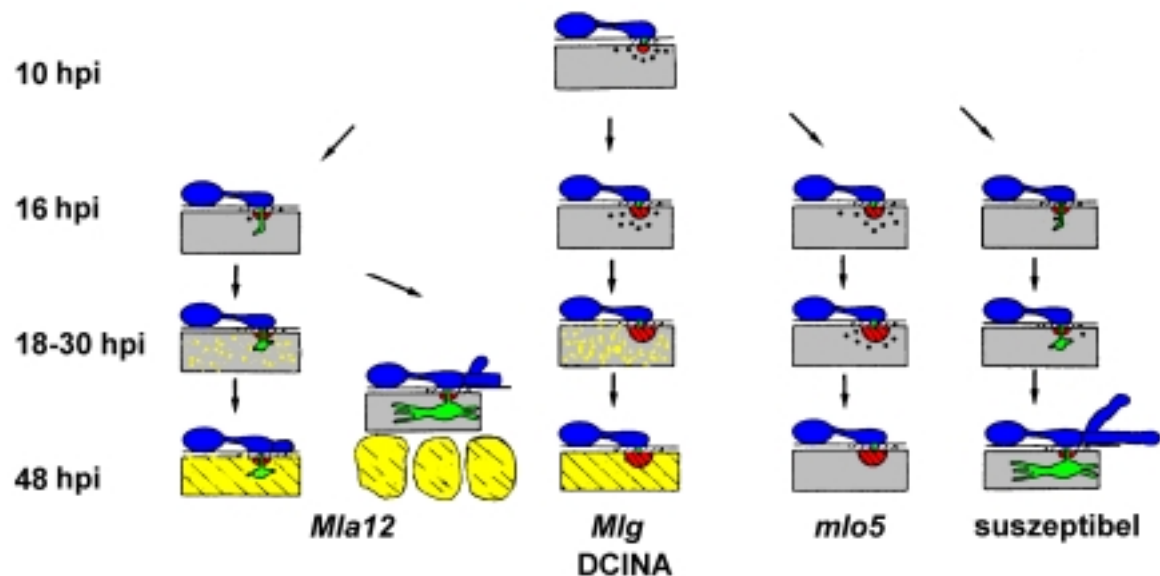


Abb. 1.5 Schematische Übersicht über die Abwehrmechanismen von Gerste nach Befall mit *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* der Rasse A6.

Auf die Ausbildung des pilzlichen Appressoriums einer ausgekeimten Konidie (blau) und den Penetrationsversuch reagiert die attackierte Zelle mit Cytoplasmaaggregationen und Ausbildung einer Zellwandapposition (Papille, rot). Ab 16 hpi (*hours post inoculation*) werden Unterschiede zwischen den isogenen Gerstenlinien, die sich nur im Resistenzgen unterscheiden, sichtbar: Während der Pilz die Epidermiszellen susceptibler und *Mla12*-resistenter Linien penetrieren und ein Haustorieninitial (grün) ausbilden kann, wird er in *Mlg*- und *mlo5*-resistenten Linien durch eine effektive Papille (rot) an der Penetration gehindert. In susceptiblen Linien werden nach vollständiger Entwicklung des Haustoriums Sekundärhyphen gebildet und der Entwicklungszyklus mit der Konidienbildung abgeschlossen (s. auch Abb. 1.4). In der *Mla12*-vermittelten Resistenz kommt es ab 24 hpi zu einer Hypersensitiven Reaktion (HR) der penetrierten Epidermiszelle (gelb) oder ab 36 hpi zu einer HR der Mesophyllzellen, die unterhalb der penetrierten Zelle liegen, wodurch der Pilz in seiner Entwicklung gestoppt wird. In *Mlg*-tragenden oder in chemisch induzierten (DCINA) Linien kann es im Anschluss an die Bildung einer effektiven Papille zu einer HR der attackierten Epidermiszelle kommen. Entnommen aus: Hückelhoven *et al.* 1999.

1.7 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Das Phänomen der systemisch Induzierten Resistenz (sIR) ist seit langem bekannt und besonders in Dikotylen wurden eine Vielzahl von Untersuchungen durchgeführt. Die Entwicklung erster chemischer Resistenzinduktoren gab dem Konzept eines neuen, nicht toxisch wirkenden, lang anhaltenden und breit wirksamen Pflanzenschutzprinzips auf Grundlage der Induzierten Resistenz neuen Vorschub. Eine Wirksamkeit der aktuellen Produkte chemischer Induktoren ist jedoch in verschiedenen Pflanzenarten nicht gleichermaßen gegeben.

Ziel dieser Arbeit war es daher, den Mechanismus der chemisch Induzierten Resistenz (cIR) in einer monokotylen Kulturpflanze genauer zu untersuchen. Dazu wurde das sehr gut charakterisierte Pathosystem von Gerste und Echtem Gerstenmehltau gewählt.

Neben cytologischen und makroskopischen Untersuchungen zur Wirksamkeit verschiedener chemischer und biotischer Induktoren im Hinblick auf eine erhöhte Resistenz gegenüber *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* sollte eine molekularbiologische Analyse der cIR in Gerste durchgeführt werden. Dazu sollten in einem differentiellen Ansatz Gene identifiziert werden, die zu frühen Zeitpunkten nach chemischer Resistenzinduktion exprimiert werden und an der Signaltransduktion und/oder an dem Abwehrmechanismus der cIR beteiligt sein könnten. Die Charakterisierung der identifizierten Gene auf Expressionsebene sollte eine Beurteilung ihrer potentiellen Rolle in der cIR ermöglichen. Daneben sollte die Eignung der Gene als Marker der IR überprüft werden. Der Nutzen solcher Marker liegt in der sicheren Überprüfung des Resistenzstatus einer Pflanze ohne aufwendige Biotests durchführen zu müssen und im Einsatz bei der Entwicklung neuer wirksamer Resistenzinduktoren.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 PFLANZENMATERIAL

Es wurden Gerstenpflanzen (*Hordeum vulgare* L.) der Sorten (cv.) Ingrid, Manchuria, Pallas und Golden Promise und Weizenpflanzen (*Triticum aestivum* L.) cv. Kanzler verwendet (Tab. 1). Zusätzlich wurden nahezu isogene Rückkreuzungslinien von Gerste cv. Ingrid (*backcross* Ingrid, *BCIngrid*) und cv. Pallas (*BCPallas*) eingesetzt, in die die Resistenzgene *Mlg*, *Mla12* und *mlo5* gegen den Echten Mehltupilz, wie bei Kølster *et al.* (1986) beschrieben, eingekreuzt wurden (Tab. 2.1). Des weiteren wurde die Mutante der Linie *BCIngrid-mlo5* A89 verwendet, die einen Defekt in einem vom *mlo5*-Resistenzgen unabhängigen Locus besitzt (Genotyp *mlo5, ror1-2*; Freialdenhoven *et al.* 1996; Tab. 2.1). Dieser *Ror*-Locus charakterisiert ein Gen, das für die Funktion der *mlo*-Resistenz benötigt wird (*required for mlo-specified resistance*), d.h. die Resistenz gegenüber Echtem Mehltau ist in der Mutante A89 unvollständig.

Die Gerstensorte Ingrid und deren Rückkreuzungslinien stammen von James McKey, University of Uppsala, Schweden. Die Sorte Pallas wurde von Lisa Munk, Department of Plant Pathology, Royal Veterinary and Agricultural University, Kopenhagen, Dänemark, und die Linien A89 und Golden Promise wurden von Paul Schulze-Lefert, Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Köln, zur Verfügung gestellt. Die sechszeilige Wintergerste cv. Manchuria, die kein bekanntes Resistenzgen gegen Echten Mehltau besitzt, wurde von Christof Löwer, Institut für Biometrie, JLU Gießen, bereitgestellt. Der Winterweichweizen cv. Kanzler, ebenfalls ohne bekanntes Resistenzgen gegen Echten Mehltau, wurde von der Saatzucht Engelen-Büchling oHG, Büchlingen/Oberschneiding, bezogen.

Das 12-36 h im Dunkeln auf feuchtem Filterpapier vorgekeimte Saatgut wurde, wenn nicht anders beschrieben, zu je 5 Körnern an den Rand eines Vierkanttopfes (8×8 cm) in Fruhstorfer Erde vom Typ P ausgelegt, mit Erde bedeckt und regelmäßig mit Leitungswasser gegossen. Alle Pflanzen wurden in Klimaschränken oder -kammern bei 16-18 °C, 50-60 % relativer Luftfeuchte und einer Lichtperiode von 16 h mit 3000 bzw. 5000 lux (50 bzw. 60 $\mu\text{E s}^{-1} \text{m}^{-2}$) 5-8 Tage lang kultiviert und im Keimlingsstadium in den Versuchen verwendet. Bei Experimenten, in denen Applikationen an Primärblättern durchgeführt wurden, waren diese vollständig entwickelt.

Pflanzen, die bis zur Entwicklung von Ähren kultiviert werden sollten, wurden einzeln in Fruhstorfer Erde LD 80 getopft, regelmäßig gegossen, bei Bedarf in größere Töpfe umgetopft und im Gewächshaus zusätzlich beleuchtet.

Für die Untersuchung verschiedener Blattgewebe wurde zu verschiedenen Erntezeitpunkten die Epidermis der abaxialen Blattspreite von Gerstenprimärblättern abgezogen und getrennt vom restlichen Blattgewebe (Mesophyll und Epidermis der adaxialen Blattspreite) in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C aufbewahrt.

2.2 PATHOGENE UND SCHÄDLINGE

2.2.1 *Blumeria graminis*

Für die Inokulation von Gerstenpflanzen mit dem Echten Gerstenmehltaupilz wurden Konidiosporen von *Blumeria [syn Erysiphe] graminis* f.sp. *hordei* Speer der Rasse A6 (*BghA6*) verwendet. *BghA6* besitzt u.a. die zu den Resistenzgenen *Mlg* und *Mla12* korrespondierenden Avirulenzgene und wurde von Jörn Pons-Kühnemann, Institut für Biometrie, JLU Gießen, zur Verfügung gestellt. Die Nachzucht des Inokulums erfolgte in Klimakammern bzw. -schränken bei gleichen Bedingungen, wie für die Pflanzenanzucht beschrieben (s. 2.1), durch Übertragung der Konidien von befallenem Pflanzenmaterial auf regelmäßig angezogene, sieben Tage alte Gerstenpflanzen cv. Golden Promise.

Tab. 2.1 Interaktion der verwendeten Gersten- bzw. Weizenlinien mit dem Echten Gersten- bzw. Weizenmehltaupilz.

Linie	<i>Blumeria graminis</i> f.sp. (Rasse)	Interaktionstyp	Infektionstyp
Ingrid	<i>hordei</i> (A6)	kompatibel	voll anfällig
BCIngrid- <i>Mlg</i>	<i>hordei</i> (A6)	inkompatibel	resistent (Rassen-Sorten-spezifisch)
BCIngrid- <i>Mla12</i>	<i>hordei</i> (A6)	inkompatibel	resistent (Rassen-Sorten-spezifisch)
BCIngrid- <i>mlo5</i>	<i>hordei</i> (A6)	inkompatibel	resistent (Rassen-Sorten-unspezifisch)
A89	<i>hordei</i> (A6)	kompatibel	intermediär (Rassen-Sorten-unspezifisch)
Pallas	<i>hordei</i> (A6)	kompatibel	voll anfällig
BCPallas- <i>mlo5</i>	<i>hordei</i> (A6)	inkompatibel	resistent (Rassen-Sorten-unspezifisch)
Golden Promise	<i>hordei</i> (A6)	kompatibel	voll anfällig
Manchuria	<i>hordei</i> (A6)	kompatibel	voll anfällig
Manchuria	<i>tritici</i> (Feldisolat)	inkompatibel	resistent (Nicht-Wirt)
Kanzler	<i>tritici</i> (Feldisolat)	kompatibel	voll anfällig

Für die Inokulation mit dem Echten Weizenmehltaupilz wurden Konidien von *Blumeria graminis* f.sp. *tritici* Speer (*Bgt*) verwendet. Bei *Bgt* handelte es sich um ein Feldisolat aus Aachen, das 1995 von Uli Beckhove, IPAZ Gießen, von Weizen isoliert und dem Institut zur Verfügung gestellt wurde. In Klimakammern bzw. -schränken wurde das Isolat unter den in 2.1 genannten Bedingungen auf Weizen cv. Kanzler erhalten.

2.2.2 *Cochliobolus sativus*

Cochliobolus sativus (Ito & Kuribayashi) Drechsler ex Dastur (anamorph: *Bipolaris sorokiniana* [Sacc. in Sorok.] Shoemaker) Feldisolat KN1 aus Banaras, Indien, wurde von Jagdish Kumar, Indian Council of Agricultural Research, Karnal, Indien, im April 1999 isoliert und zur Verfügung gestellt. Ein anderes *Cochliobolus sativus* Feldisolat aus Bangladesh ('*Drechslera sorokiniana*' 01) der Kulturensammlung des IPAZ wurde von Ismail Hossain, Department of Plant Pathology, Agricultural University Mymensingh, Mymensingh, Bangladesh, 1998 von Weizen isoliert und dem Institut zur Verfügung gestellt. Beide Isolate wurden auf PDA (*potato-dextrose-agar*, Merck, Darmstadt) bei 25° C im Dunkeln kultiviert und alle drei bis vier Wochen auf frischen Agar überimpft. Durch Inkubation der Kulturplatten bei RT und Tageslicht kam es zur Sporulation. Die Kultivierung des Pilzes erfolgte durch Elke Stein, IPAZ Gießen.

2.2.3 *Rhynchosporium secalis*

Von natürlich mit *Rhynchosporium secalis* Heinsen ex A.B. Frank befallenen Pflanzen einer japanischen Gerstenmischkultur wurden die jüngsten Blätter mit starken Symptomen Ende April 1999 im Freiland (Versuchsfeld Weilburger Grenze, Institut für Pflanzenzüchtung, JLU Gießen) geerntet.

2.2.4 Bakterien

Es wurden Versuche mit *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (DC3000), *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* (PG4180), *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Pss61) und *Bacillus subtilis* (*Bs*) durchgeführt. Die Kulturen wurden auf King's B-Agar bei 4 °C im Dunkeln erhalten. *Bacillus subtilis* stammte aus der Kulturensammlung des eigenen Institutes (von 1985), die verschiedenen *Pseudomonas* Stämme wurden von Ina Budde und Matthias Ullrich, Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Marburg, zur Verfügung gestellt. Ein Bakterium (*Paenibacillus polymyxa*, E3) wurde als Verunreinigung auf Agarplatten mit Blattsegmenten isoliert und in eine Untersuchung miteinbezogen. Die Kultivierung der Bakterien erfolgte durch Elke Stein, IPAZ Gießen.

- ◆ King's B-Medium: 10 g Difco Proteose Pepton #3 (Becton Dickinson, Sparks, USA)
 1,5 g K₂HPO₄
 15 g Glycerin
 ad 1 L mit A. dest., → pH 7 mit HCl, autoklaviert
 5 mM MgSO₄

- ◆ King's B-Agar: King's B-Medium (s.o.) mit 1,5 % Agar-Agar (Serva, Heidelberg),
 autoklaviert

2.2.5 *Sitobion avenae*

Blattlausbefall von Gerste wurde mit der Großen Getreideblattlaus (*Sitobion avenae* F.) hervorgerufen, die von Stefan Vidal, Institut für Pflanzenpathologie, Georg-August-Universität Göttingen, zur Verfügung gestellt wurde. Die Nachzucht der Läuse erfolgte auf Gerstenpflanzen cv. Ingrid im Käfig unter Zusatzlicht bei ca. 25 °C.

2.3 BEHANDLUNG DES PFLANZENMATERIALS

2.3.1 Inokulation

2.3.1.1 *Blumeria graminis*

Primärblätter sieben Tage alter Keimlinge wurden durch Abschütteln der Konidien befallener Pflanzen in einem Inokulationsturm mit 1-8 Konidien mm⁻² von *Bgh*A6 oder *Bgt* (Feldisolat) inokuliert und in Klimaschränken bzw. -kammern inkubiert (s. 2.1). Bei Versuchen, in denen die Mehltaukolonien zur Bestimmung der Befallsdichte ausgezählt werden sollten, wurden die Primärblätter vor der Inokulation mit der adaxialen Seite nach oben mit Hilfe von Klebestreifen auf Tablett fixiert. Mit Kontrollpflanzen wurde bis auf das Abschütteln von Sporen ebenso verfahren (*mock*[Schein]-Behandlung). Zur Auswertung 6-7 dpi (*days post inoculation*) wurden Segmente inokulierter und *mock*-behandelter Primärblätter auf 0,5 %igen Wasseragar mit 20 mg L⁻¹ Benzimidazol gelegt. Zur Überprüfung einer resistenzinduzierenden Wirkung verschiedener Behandlungen wurden die Keimlinge zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Behandlung mit 1-8 Konidien mm⁻² von *Bgh* inokuliert und in Klimaschränken bzw. -kammern inkubiert (s. 2.1).

2.3.1.2 *Cochliobolus sativus*

Für die Inokulation mit *Cochliobolus*-Konidien wurde von Kulturplatten mit sporulierendem Pilz (s. 2.2.2) vorsichtig Oberflächenmycel abgeschabt, durch Mull gefiltert und eine Suspension in 0,02 %iger wässriger Tween20-Lösung hergestellt.

Nach Besprühen von Blattsegmenten sieben Tage alter Pflanzen mit 20 000 Konidien mL⁻¹ wurden diese auf 0,5 %igen Wasseragar mit 20-40 mg L⁻¹ Benzimidazol ausgelegt und in verschlossenen Schalen im Klimaschrank bei 25 °C und 16 h Lichtperiode bis zur Aufarbeitung der Blattsegmente inkubiert.

Alternativ wurde eine Sprühinokulation sieben Tage alter Gerstenpflanzen mit 60-90 000 Konidien mL⁻¹ durchgeführt und die Pflanzen anschließend in befeuchteten und verschlossenen durchsichtigen Plastikboxen (60 x 40 x 36 cm) in einer Klimakammer bei 23 °C, 70 % relativer Luftfeuchte und 16 h Lichtperiode bis zur Aufarbeitung der Blätter gehalten.

2.3.1.3 Bakterien

Die Inokulation mit Bakterien (durchgeführt von Elke Stein, IPAZ Gießen) erfolgte durch Druckinfiltration von max. 100 µL der Bakteriensuspensionen mittels einer Infiltrationszange (Hagborg 1970) in Primär- und Sekundärblätter sieben bzw. vierzehn Tage alter Pflanzen. Dazu wurde King's B-Medium (s. 2.2.5) mit den verschiedenen Stämmen angeimpft und über Nacht bei 28 °C im Dunkeln geschüttelt. Nach Pelletieren der Suspension und zweimaligem Waschen mit dem Infiltrationsmedium (5 mM MgSO₄) wurden die Bakterien in diesem resuspendiert und auf eine optische Dichte OD_{600 nm} von 0,2 (entspricht ca. 10⁷ Bakterien) eingestellt. Zur Kontrolle wurde das Infiltrationsmedium alleine infiltriert. Die Pflanzen wurden anschließend in Klimaschränken gehalten (s. 2.1).

2.3.1.4 *Sitobion avenae*

Zur Simulation eines Blattlausbefalls wurden Primärblätter acht Tage alter Keimlinge mit je drei ungeflügelten L4-Stadien von *Sitobion avenae* F. besetzt und in Käfigen bei 25 °C und 16 h Lichtperiode gehalten.

2.3.2 Applikation chemischer Resistenzinduktoren

Alle Behandlungen mit chemischen Resistenzinduktoren wurden, wenn nicht anders beschrieben, bei Gerste an 5-8 Tage alten Keimlingen durchgeführt. Behandelte Pflanzen (je 5 in einem Topf) wurden in Klimaschränken oder -kammern weiter kultiviert (s. 2.1).

2,6-Dichlorisonikotinsäure (DCINA, CGA41396, Ciba-Geigy, jetzt Syngenta, Basel, Schweiz) wurde als Formulierung von 25 % aktiver Substanz mit *wettable powder* (WP)

oder nach Vorlösen der Reinsubstanz mit Dimethylformamid (DMF) in wässriger Lösung (1 % DMF) mit NaOH auf pH 7 eingestellt und in Konzentrationen von 5 und 10 mg L⁻¹ (entspricht 0,02 bzw. 0,04 mM) bezogen auf das Bodenvolumen über den Boden appliziert. Kontrollpflanzen wurden mit WP- oder 1 %iger DMF-Lösung gegossen.

Benzo(1,2,3)thiadiazol-7-carbothionsäure-*S*-methylester (BTH, auch Azibenzolar-*S*-methyl, CGA245704, Bion[®], Ciba-Geigy, jetzt Syngenta, Basel, Schweiz) wurde als Formulierung von 50 % aktiver Substanz mit WP in Wasser in Konzentrationen von 63, 100, 125 und 250 mg L⁻¹ (entspricht 0,3, 0,48, 0,6 bzw. 1,2 mM) gesprüht, bis die Blätter gleichmäßig von feinen Tröpfchen bedeckt waren. Eine Bodenapplikation erfolgte in Konzentrationen von 20 und 50 mg L⁻¹ (entspricht 0,095 bzw. 0,24 mM) bezogen auf das Bodenvolumen. Kontrollpflanzen wurden entsprechend mit WP-Lösung behandelt.

Salicylsäure (SA) wurde direkt in Wasser gelöst oder nach Vorlösen in DMF in wässriger Lösung (1 % DMF) mit NaOH auf pH 6-7 eingestellt und in Konzentrationen von 50 und 100 mg L⁻¹ (entspricht 0,36 bzw. 0,72 mM) bezogen auf das Bodenvolumen über den Boden appliziert. Kontrollpflanzen wurden mit Wasser oder 1 %iger DMF-Lösung gegossen.

2.3.3 Applikation von Phytohormonen

Behandlung mit Jasmonsäuremethylester (JM) erfolgte in Glaspetrischalen durch 'Floaten' von Primärblättern sieben Tage alter Pflanzen auf einer Lösung von 45 µM JM in Klimakammern (s. 2.1). Kontrollblätter wurden auf Wasser 'gefloatet'.

Abscisinsäure (ABA) wurde durch Sprühen einer wässrigen Lösung von 50 µM auf sieben Tage alte Keimlinge appliziert, bis sie gleichmäßig von feinen Tröpfchen bedeckt waren. Kontrollpflanzen wurden mit Wasser besprüht. Behandelte Pflanzen wurden in Klimakammern inkubiert (s. 2.1).

Primärblätter sieben Tage alter Pflanzen wurden auf angefeuchtetem Filterpapier in gasdichten Erlenmeyerkolben mit Ethylengas in Konzentrationen von 0,001, 1, 10 und 100 µL L⁻¹ (entspricht 0,028, 28, 280 bzw. 2800 µM) im Klimaschrank inkubiert (s. 2.1). Kontrollblätter wurden mit Luft begast.

2.3.4 Applikation von Sorbit

Durch 'Floaten' von Primärblättern sieben Tage alter Keimlinge auf 1 M Sorbit-Lösung kann über den dabei entstehenden osmotischen Stress der endogene Jasmonatgehalt in Gerste erhöht werden (Lehmann *et al.* 1995). Zur Überprüfung des erhöhten Jasmonatgehaltes behandelter Blätter wurde die Genexpression von *Jip-23* (jasmonatinduziertes Protein 23, Ortel *et al.* 1999; Hause *et al.* 1999) in Gelblot Analysen nachgewiesen. Die entsprechende Sonde wurde von Claus Wasternack, Leibniz Institut für

Pflanzenbiochemie, Halle, zur Verfügung gestellt. Kontrollblätter wurden unter sonst gleichen Bedingungen in Klimakammern (s. 2.1) auf Wasser 'gefloated'.

2.3.5 Verwundung

Eine Verwundung wurde durch Perforation der Primärblätter sieben Tage alter Pflanzen mit 15 Nadeln cm^{-2} erreicht. Kontrollpflanzen blieben unverletzt und wurden zusammen mit den Verwundeten im Klimaschrank weiter kultiviert (s. 2.1).

2.4 MIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNG DER RESISTENZINDUKTION

Zur Analyse der Abwehrreaktionen der Pflanze gegenüber dem Echten Mehltaupilz auf zellulärer Ebene wurden Interaktionsstellen auf Primärblättern mikroskopiert. Dazu wurden die Blätter für 48 h entfärbt (Ethanol/Chloroform 4:1 [v/v], 0,15 % Trichloressigsäure [w/v]) und anschließend in 50 %igem Glycerin gelagert. Das Auffinden pilzlicher Strukturen auf der Blattoberfläche wurde durch Anfärben des Pilzes mit essigsaurer Tinte (Blaue Tinte [Pelikan, 4001]/25 %ige Essigsäure 1:9 [v/v]) erleichtert. Es wurde jeweils die adaxiale Seite eines Blattes in 50 %igem Glycerin mit 250-facher Vergrößerung unter Ölimmersion mikroskopiert. Dabei wurden nur Typ A- (an Stomata grenzende Epidermiszellen) und Typ B-Zellen (an Typ A-Zellen grenzende Epidermiszellen) in die Auswertung einbezogen (Koga *et al.* 1990). Die über den Leitbündeln liegenden Typ C-Zellen weisen grundsätzlich eine höhere Penetrationsresistenz auf und wurden in der Untersuchung nicht berücksichtigt (Koga *et al.* 1990). Das verwendete Zeiss Axioplan Mikroskop ist mit einer Halogenlampe (12 V, 100 W) für Durchlicht- und mit einer Quecksilberhochdrucklampe (HBO 50 W, Osram) für Auflichtfluoreszenzmikroskopie ausgestattet. Durch UV-Lichtanregung unter Verwendung eines Erregerfilters (485 nm), eines Farbteilers (510 nm) und eines Langpassfilters (≥ 520 nm) wurden gelb autofluoreszierende phenolische Substanzen sichtbar gemacht, die in Papillen und hypersensitiv reagierenden Zellen akkumulieren. Zur besseren Darstellung von Feinstrukturen wurde im Durchlicht differentieller Interferenzkontrast verwendet. Mit Hilfe einer dem Mikroskop aufgesetzten Kamera mit automatischer Belichtungseinstellung konnten die Ergebnisse auf 64 ASA-Filmen (Kodak, Kunstlichtfilm Ektachrom 64 T) bei Durchlichtmikroskopie und auf 400 ASA-Filmen (Kodak, Tageslichtfilm Ektachrom Elite 2) bei Fluoreszenzmikroskopie dokumentiert werden. Später stand eine digitale Kamera (AxioCam, Zeiss, Göttingen) zur Dokumentation mit dem Programm AxioVision 2.0.5 (Zeiss, Göttingen) zur Verfügung.

2.5 ERZEUGUNG EINER SUBTRAHIERTEN cDNA BANK

Die für diese Arbeit bereitgestellten 480 Klone mit cDNA-Fragmenten potentiell differentiell exprimierter Gene stammten aus einer subtrahierten cDNA-Bank von Birgit Jarosch, IPAZ Gießen (Jarosch, Dissertation in Vorbereitung). Zur Erzeugung dieser cDNA-Bank wurden fünf Tage alte Gerstenpflanzen der Mutante A89 mit 5 mg L⁻¹ DCINA bezogen auf das Bodenvolumen bzw. mit WP als Kontrolle begossen (s. 2.3.2). Aus den Primärblättern wurde nach 12, 24 und 48 h Gesamt-RNA nach Dudler *et al.* (1991) extrahiert und jeweils gleiche RNA-Mengen von DCINA- bzw. WP-Proben der verschiedenen Erntezeitpunkte vereinigt. Nach Isolierung von poly(A)⁺-RNA mit Hilfe des *Dynabeads mRNA Purification Kit* (Dynal, Hamburg) und reverser Transkription der mRNA wurde eine suppressive Subtraktionshybridisierung (SSH, Diatchenko *et al.* 1996) durchgeführt (*PCR-SelectTM cDNA Subtraction Kit*, Clontech, Heidelberg). Dabei wurde doppelsträngige cDNA von nicht-induzierten Kontrollpflanzen mit der DCINA-induzierter Pflanzen nach *RsaI*-Restriktionsverdau und Adapterligation hybridisiert. Die cDNA-Fragmente differentiell exprimierter Gene standen dann für eine nachfolgende Suppressions-PCR als *template* zur Verfügung, in der sie unter Angleichung der Anzahl selten und häufig vorhandener Fragmente angereichert wurden. Die so gewonnenen PCR-Produkte subtrahierter cDNA-Fragmente wurden über T/A-Klonierung in pTAdv-Vektoren ligiert und in TOP 10F' *E. coli*-Zellen transformiert (Clontech, Heidelberg). In der anschließenden Blau/Weiss-Selektion (α -Komplementierung defekter β -Galactosidase, Sambrook *et al.* 1989) wurden insgesamt 1680 Bakterienkolonien mit integrierten cDNA-Fragmenten identifiziert und nach vierstündigem Schütteln bei 37 °C in LB-Medium mit Ampicillin und 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) bei -20 °C gelagert.

- ◆ LB-Medium: 10 g *bacto-tryptone* (GibcoBRLTM, Karlsruhe)
 5 g *bacto-yeast-extract* (GibcoBRLTM, Karlsruhe)
 10 g NaCl
 ad 1 L mit A. dest., → pH 7 mit NaOH, autoklaviert

- mit Ampicillin: 100 µg Ampicillin (Stammlösung 100 mg mL⁻¹, in A. dest. unter
 mL⁻¹ Zugabe von NaOH gelöst und sterilfiltriert)

2.6 IDENTIFIZIERUNG DIFFERENTIELL EXPRIMIERTER GENE

2.6.1 Kolonie-PCR

Die einzelnen Klone der subtrahierten cDNA-Bank (s. 2.5) wurden zunächst auf die Größe der inserierten cDNA-Fragmente hin überprüft. Dazu wurde eine Kolonie-PCR mit Primern (*nested* 1 und *nested* 2R) durchgeführt, die komplementär zu der Sequenz der Adapter sind, die an die *RsaI*-geschnittenen cDNA-Fragmente ligiert wurden, und somit den inserierten Bereich direkt flankieren (s. 2.5). Jeweils 5 µL der Bakterienkulturen wurden in 15 µL A. bidest. 5 min bei 98 °C denaturiert und 10 µL der denaturierten Kultur zu 20 µL PCR-Mix pipettiert. Die Amplifikation erfolgte dann in 1x PCR-Puffer (Silverstar, Eurogentec, Heidelberg) mit 1,5 mM MgCl₂, je 0,2 mM dNTP, je 0,4 µM Primer (s.u.) und 0,5 u Taq-Polymerase (Silverstar, Eurogentec, Heidelberg) als Endkonzentration im PCR-Ansatz (30 µL). Der Temperaturzyklus der Amplifikation verlief in einem *Thermocycler* (Perkin Elmer 9600):

	3 min	94 °C	Denaturierung
	15 s	94 °C	Denaturierung
35x	30 s	68 °C	Primeranlagerung (<i>annealing</i>)
	60 s	72 °C	Primerverlängerung (DNA-Synthese)
	5 min	72 °C	Komplettierung der DNA-Doppelstränge
	∞	4 °C	Abbruch der Reaktion

- ◆ *nested* 1-Primer: 5'-TCGAGCGGCCGCCCCGGGCAGG-3'
- ◆ *nested* 2R-Primer: 5'-AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT-3'

Der komplette PCR-Ansatz wurde anschließend mit 7,5 µL 5x DNA-Auftragspuffer versetzt, wovon 10 µL im 1,5 %igen Agarosegel mit Ethidiumbromid (0,16 µg mL⁻¹) in 1x TBE-Puffer gelelektrophoretisch aufgetrennt wurden. Als Größenstandard diente ein 1 kb⁺-Marker. Bei Vorhandensein eines *inserts* ≥ 100 bp Größe wurde die Kultur mit einem sterilen Zahnstocher zur Erhaltung auf LB-Agarplatten mit Ampicillin übertragen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Die cDNA-Fragmente wurden z.T. nachträglich entweder in pCR[®]II-TOPO-Vektor umklont und in TOP10 *one shot*-Zellen nach Herstellerangaben transformiert (*TOPO TA Cloning Kit Dual Promoter*, Invitrogen, Groningen, Niederlande), oder in pGEM-T-Vektor (Promega, Mannheim) kloniert und in DH5α-Zellen (Clontech, Heidelberg) transformiert. Dazu wurde eine Kolonie-PCR-Reaktion (mit *nested* 1/2R-Primern, s.o.) durchgeführt, die PCR-Produkte im Agarosegel aufgetrennt (s.o.), aus dem Gel eluiert (*Quiaquick Gel Extraction Kit*, Qiagen, Hilden), laut Herstellerangaben in den entsprechenden Vektor ligiert und in *E. coli*-Zellen transformiert.

- ◆ LB-Agar: LB-Medium (s. 2.5) mit 1,5 % Agar-Agar (Serva, Heidelberg), autoklaviert
 - mit Ampicillin: 100 µg mL⁻¹ Ampicillin (s. 2.5)
 - ◆ 5x DNA-Auftragspuffer: 50 % 10x Farbmaler, 50 % 10x TBE
 - ◆ 10x Farbmaler: 0,25 % Bromphenolblau, 40 % Sucrose
 - ◆ 10x TBE: 0,9 M Tris, 0,9 M Borsäure, 25 mM EDTA, autoklaviert
- Geringer konzentrierter TBE-Puffer wurde aus der *stock*-Lösung entsprechend mit autoklaviertem A. bidest. verdünnt.
- ◆ 1 kb+-Marker: 1 µg 1 Kb PLUS DNA Ladder™, (GibcoBRL™ Life Technologies™, Karlsruhe) in 1x TBE und 1x Farbmaler

2.6.2 Reversed Northern-Analysen

Bei *Reversed Northern*-Analysen handelt es sich um eine Hybridisierung von immobilisiertem cDNA-Amplifikaten mit einer komplexen cDNA-Erststrangsonde, d.h. im Vergleich zu *Northern*-Analysen sind mobiler und fixierter Hybridisierungspartner miteinander vertauscht und anstelle von RNA wird cDNA eingesetzt. Für die Experimente wurden je 10 µL eines PCR-Ansatzes (s. 2.6.1) in zwei identischen Gelen elektrophoretisch getrennt und auf positiv geladene Nylonmembranen (Boehringer, Mannheim) in 2x SSC-Puffer bei RT über Nacht mittels Kapillarstromtransfer 'geblottet' (Sambrook *et al.* 1989). Die PCR-Produkte wurden denaturiert, indem die *Blot*-Membran mit der DNA-Seite nach oben 2x 5 min auf Filterpapier gelegt wurde, das mit 0,5 M NaOH/1,5 M NaCl getränkt war. Anschließend wurde die Membran 2x 5 min auf 0,5 M Tris-Cl/1,5 M NaCl pH 7,4 neutralisiert, kurz in 2x SSC-Puffer gespült und die DNA durch UV-*crosslinking* (125 mJ) kovalent an die Membran gebunden (*GS Gene Linker*™ UV chamber, Bio-Rad, München).

Vor der Hybridisierung wurden die Membranen 3x 20 min in 2x SSC, 0,1 % SDS bei RT gewaschen (Schüttler) und 30 min bei 50 °C im Hybridisierungssofen mit *Dig Easy Hyb*-Puffer (Boehringer, Mannheim) prähybridisiert. Danach wurden die Membranen mit zwei unterschiedlichen komplexen Digoxigenin-markierten (Boehringer, Mannheim) cDNA-Erststrangsonden bei 50 °C über Nacht hybridisiert. Die cDNA-Erststrangsonden wurden von Birgit Jarosch, IPAZ Gießen, mit Oligo-dT-Primern aus RNA von Kontroll- und DCINA-behandelten Pflanzen hergestellt (Jarosch, Dissertation in Vorbereitung). Sie waren auf eine gleiche Signalintensität angeglichen und lagen in je 10 mL *Dig Easy Hyb*-Puffer vor, in dem sie mindestens 10 min bei 68 °C vor Gebrauch denaturiert und nach der Hybridisierung wieder bei -20 °C gelagert wurden.

Die Immunodetektion erfolgte nach stringentem Waschen mit 0,1x SSC, 0,1 % SDS bei 68 °C mit Anti-Digoxigenin-Antikörpern über Chemilumineszenz entsprechend der Herstellerangaben für *Anti-Dig-AP*, *Fab fragments* und *CDP-Star*™ (Boehringer,

Mannheim). Durch Exposition eines Röntgenfilms (Kodak X-OMAT™ AR, Röntgen Bender, Baden-Baden) mit der eingeschweißten Membran wurde die Hybridisierung der Sonde mit dem PCR-Produkt durch Schwärzung des Filmes nach dessen Entwicklung (Entwickler G 153 A, Schnellfixierbad G 354, Agfa, Röntgen Bender, Baden-Baden) sichtbar.

Klone, deren Hybridisierung mit beiden Sonden differentielle Signale ergaben, wurden in einem zweiten *Reversed Northern*-Durchgang erneut überprüft.

- ◆ 20x SSC-Puffer: 3 M NaCl, 0,3 M Tri-Natriumcitrat, → pH 7 mit HCl, autoklaviert
 - ◆ 10 % SDS: 10 % *sodiumdodecylsulfate* (w/v) in A. bidest., autoklaviert
- Geringer konzentrierte Puffer wurde aus der stock-Lösung entsprechend mit autoklaviertem A. bidest. verdünnt.

2.6.3 Plasmidpräparation

Die Plasmidminipräparation zur Isolierung rekombinanter Plasmid-DNA aus Bakterienzellen wurde mit TELT (Bernd Weisshaar, *Lab-Methods*, Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Köln), oder *Qiaprep Kit* (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Gleichzeitig wurden *glycerolstocks* von den Klonen angelegt (150 µL Glycerin, 850 µL Bakterienkultur) und bei -70 °C gelagert. Dazu wurden 4 mL LB-Medium mit Ampicillin (s. 2.5) durch Aufnahme einer Einzelkolonie mit einem sterilen Zahnstocher angeimpft, bei 37 °C über Nacht geschüttelt und anschließend für die Plasmidpräparation pelletiert.

Die Aufarbeitung mit dem *Qiaprep Kit* erfolgte laut Herstellerangaben. Bei der TELT-Methode wurde das Bakterienpellet in 200 µL TELT-Puffer resuspendiert, 40 µL Lysozym (10 mg mL⁻¹ in TE) zugegeben, vorsichtig über Kopf geschwenkt und 3 min bei RT inkubiert. Zur Inaktivierung des Lysozyms wurden die Proben für 1 min bei 95 °C erhitzt (Heizblock), anschließend 5 min auf Eis inkubiert, zentrifugiert (15 min, 20800 rcf, 4 °C) und das Zelltrümmerpellet mit einem Zahnstocher entfernt. Der Überstand wurde mit 100 µL Isopropanol gemischt, 10 min bei RT gefällt und das Pellet nach Zentrifugation (wie oben) mit 400 µL 70 %igem Ethanol (-20 °C) gewaschen, in 100 µL TE/R gelöst und 15 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurden 100 µL 4 M NH₄Ac zugegeben, gemischt und mit 600 µL Ethanol 5 min bei RT inkubiert, das Pellet nach Zentrifugation (wie oben) mit 400 µL 70 %igem Ethanol gewaschen und in 15 µL A. bidest. gelöst.

- ◆ TELT: 50 mM Tris/Cl pH 7,5; 62,5 mM EDTA (*stock*-Lösung pH 8,0); 2,5 M LiCl; 0,4 % Triton-X 100, autoklaviert
- ◆ TE: 10 mM Tris/Cl pH 7,5; 0,1 mM EDTA, autoklaviert
- ◆ TE/R: 10 µg mL⁻¹ RNase A in TE

Algorithmus auf Ähnlichkeiten mit anderen Sequenzen (Gene, ESTs [*expressed sequence tags*] und Proteine) untersucht (Altschul *et al.* 1997). Das Auffinden bestimmter Motive in den Sequenzen erfolgte durch Vergleiche mit bekannten Proteinmotivmustern in der *Prosite*-Datenbank (*ExPasy Molecular Biology Server, Swiss Institute of Bioinformatics [SIB]*). *Alignments* zum Vergleich von zwei oder mehreren Sequenzen miteinander wurden mit *ClustalW* (*European Molecular Biology Laboratory [EMBL] outstation - European Bioinformatics Institute [EBI]*) und dem Programm *GeneDoc* (*Multiple Sequence Alignment Editor & Shading Utility, Nicholas & Nicholas 1997*) durchgeführt.

2.6.5 Sondenherstellung

Zur Überprüfung einer differentiellen Genexpression in *Northern*-Analysen wurden von Sequenzen, die in *Reversed Northern*-Analysen als cDNA-Fragmente potentiell differentiell exprimierter Gene identifiziert worden waren, und von *HvPR1b* (Bryngelsson *et al.* 1994) und *Lox2:Hv:1* (Vörös *et al.* 1998) Transkriptsonden hergestellt. Dazu wurden cDNA-Fragmente so vom Plasmid amplifiziert, dass jeweils am 3'-Ende der Sequenz in *sense*-Richtung eine Polymerase-Bindestelle vorlag, von der ausgehend anschließend der *antisense*-Strang durch *in vitro*-Transkription synthetisiert werden konnte. In der PCR-Reaktion wurden als Primer dementsprechend *M13reverse* und *M13universal* (für *HvPR1b* und *Lox2:Hv:1*) bzw. jeweils einer von beiden in Kombination mit *nested 1* oder *nested 2R* (s. 2.6.1) verwendet (s. 2.6.1, 30 Zyklen, 58 °C *annealing*-Temperatur, je 0,5 µM Primer). Das Amplifikat wurde mit dem *High Pure PCR-Product Purification Kit* (Boehringer, Mannheim) nach Herstellerangaben aufgereinigt und je 4 µL als *template* für die Reaktion mit der entsprechenden DNA-abhängigen RNA-Polymerase (SP6- oder T7-Polymerase) eingesetzt. Der Reaktionsansatz (20 µL) für nicht-radioaktive Sonden wurde mit 1x *Digoxigenin-* oder *Fluorescein-RNA-Labeling Mix* (Boehringer, Mannheim), der für radioaktive Sonden mit je 1 mM ATP, GTP und CTP, sowie 25 µCi α ^{32}P UTP, jeweils mit 40 u RNase-Inhibitor (Boehringer, Mannheim) und 40 u RNA-Polymerase in 1x Transkriptionspuffer (Boehringer, Mannheim) 2 h bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion für die nicht-radioaktive Markierung wurde durch Zugabe von 80 µL A. bidest.DEPC (s. 2.7.1) abgestoppt und das Ergebnis im Agarosegel überprüft (s. 2.7.2). Der Ansatz für die radioaktive Markierung wurde mit 30 µL A. bidest.DEPC (s. 2.7.1) versetzt, die Sonde über *MicroSpin™ G-25 Columns* (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) gemäß Herstellerangaben aufgereinigt, und die Anzahl der radioaktiven Zerfälle in einem Aliquot gemessen (cpm, *Multipurpose Scintillation Counter, Coulter™ LS6500*, Beckman, München).

Von Sequenzen, deren codierender Strang nicht eindeutig durch Sequenzvergleiche bestimmbar war, wurden DNA-Sonden mittels PCR von 1 µL Plasmid als *template* hergestellt. Die Reaktion (50 µL) für nicht-radioaktive Sonden verlief in 1x PCR-Puffer

(Silverstar, Eurogentec, Heidelberg oder Suprathem, Gene Craft, Münster) mit 1,5 mM MgCl_2 , je 0,2 mM dATP, dCTP, dGTP, 0,19 mM dTTP und 0,01 mM Digoxigenin-dUTP (Boehringer, Mannheim), je 0,5 μM Primer (*nested* 1 und *nested* 2R, s. 2.6.1) und 0,5 u Taq-Polymerase (Silverstar, Eurogentec, Heidelberg oder Suprathem, Gene Craft, Münster) (Temperaturzyklus s. 2.6.1). Das Produkt wurde im Agarosegel überprüft (s. 2.6.1.).

Für radioaktiv markierte DNA-Sonden wurde die Reaktion in 10 μL angesetzt und verlief in 1x PCR-Puffer (suprathem, Gene Craft, Münster) mit 1,5 mM MgCl_2 , je 50 μM dATP, dGTP und dTTP, 30 μCi α ^{32}P dCTP, je 0,5 μM Primer (*nested* 1 und *nested* 2R, s. 2.6.1) und 0,5 u Taq-Polymerase (Suprathem, Gene Craft, Münster) (Temperaturzyklus s. 2.6.1, 30 Zyklen). Anschließend wurden 40 μL A. bidest. zugegeben, die Sonde über *MicroSpin™ G-25 Columns* aufgereinigt und die Anzahl der radioaktiven Zerfälle bestimmt (s.o.).

- ◆ M13*reverse*-Primer: 5'-AACAGCTATGACCATGA-3'
- ◆ M13*universal* (-40)-Primer: 5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3'

2.7 UNTERSUCHUNG DER GENEXPRESSION AUF TRANSKRIPTIONSEBENE

2.7.1 RNA-Extraktion und Konzentrationsbestimmung

Primärblätter von je 5 Pflanzen aus 2-3 Töpfen wurden in flüssigem Stickstoff zu feinem Pulver gemörsert und bei -70°C gelagert. Die Extraktion von Gesamt-RNA aus ca. 300 mg Pflanzenmaterial erfolgte auf Basis einer Guanidinthiocyanat/Phenol-Extraktion mit *RNA clean* (AGS, Heidelberg) gemäß Herstellerangaben. Abweichend von diesem Protokoll wurde ein zusätzlicher Chloroform-Reinigungsschritt der wässrigen Phase eingefügt und das getrocknete RNA-Pellet in A. bidest.DEPC gelöst. Das anschließend noch vorhandene unlösliche Pellet (wahrscheinlich Polysaccharide) wurde nach Zentrifugation (15 min bei 20800 rcf, 4°C) von der RNA-Lösung getrennt.

Die Bestimmung der RNA-Konzentration nach der Extraktion erfolgte photometrisch bei 260 nm (Photometer DU 7400, Beckman, München; $\text{OD}_{260\text{ nm}}=1$ bei $40\text{ }\mu\text{g RNA mL}^{-1}$), indem 2 μL des Extraktes in A. bidest.DEPC 1:125 verdünnt wurden. Entsprechend des Gesamt-RNA-Gehaltes der jeweiligen Proben wurden gleiche Konzentrationen der Extrakte durch Verdünnung mit A. bidest.DEPC eingestellt und im Agarosegel überprüft (s. 2.7.2.1).

- ◆ A. bidest.DEPC: A. bidest., 0,1 % [w/v] DEPC (Diethylpyrocarbonat), mind. 2 h rühren, über Nacht bei 37°C inkubieren, autoklavieren

2.7.2 Northern-Analysen

2.7.2.1 Denaturierende Agarosegelelektrophorese

RNA wurde in 1-1,5 %igem Agarosegel mit 5 % [v/v] Formaldehyd (37 %) in 1x MOPS-Puffer gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die RNA-Lösung wurde dazu mit dem gleichen Volumen RNA-Auftragspuffer versetzt und vor dem Auftragen der Proben 5 min bei 96 °C im Heizblock denaturiert, um RNA-Sekundärstrukturen aufzulösen.

◆ 10x MOPS: 200 mM Morpholin-3-propansulfonsäure, 50 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA, → pH 7 mit NaOH, 1 % [v/v] DEPC, autoklaviert
Geringer konzentrierter MOPS-Puffer wurde aus der *stock*-Lösung entsprechend mit autoklaviertem A. bidest. verdünnt.

◆ RNA-Auftragspuffer:

260 µL	Formaldehyd (37 %)
720 µL	Formamid
80 µL	Glycerin, autoklaviert
80 µL	gesättigtes Bromphenolblau
160 µL	10x MOPS (s.o.)
100 µL	Ethidiumbromid (10 mg mL ⁻¹ in A. bidest _{DEPC})
ad 1,5 mL mit A. bidest _{DEPC}	

2.7.2.2 Northern Blotting

Northern Blots wurden mit 6-15 µg Gesamt-RNA nach gelelektrophoretischer Auftrennung (s. 2.7.2.1) mittels Kapillarstromtransfer in 25 mM Na-Phosphat-Puffer pH 6,5 bei RT über Nacht durchgeführt. Als Matrix diente eine positiv geladene Nylonmembran (Boehringer, Mannheim), an die die RNA durch UV-Licht (125 mJ) kovalent gebunden wurde (*GS Gene Linker*TM *UV chamber*, Bio-Rad, München).

2.7.2.3 Northern-Hybridisierung und RNA-Detektion

Vor der Hybridisierung wurden die *Blot*-Membranen in 2x SSC, 0,1 % SDS (s. 2.6.2) bei RT (Schüttler) 3x 20 min gewaschen. Die Hybridisierung selber erfolgte über Nacht bei 60 °C für PCR-Sonden (DNA) und bei 68 °C für Transkriptsonden (RNA) im Hybridisierungssofen (Hybaid, Heidelberg).

Nicht-radioaktive *Northern*-Analysen wurden gemäß dem *Dig System User Guide* (Boehringer, Mannheim) unter stringenten Bedingungen mit Digoxigenin- oder Fluorescein-markierten Sonden durchgeführt. Nach dem Waschen wurde die Membran mit 10 mL *Dig Easy Hyb*-Puffer (Boehringer, Mannheim) bei 60 oder 68 °C mindestens 30 min prähybridisiert. Für die Hybridisierung wurden jeweils 10 µL Sonde nach

Denaturierung in 80 µL Hyb-Puffer (5 min bei 96 °C) in einer Hybridisierungsröhre eingesetzt. Die Immunodetektion erfolgte nach stringentem Waschen mit 0,1x SSC, 0,1 % SDS bei 60 °C oder 68 °C mit Anti-Digoxigenin oder Anti-Fluorescein-Antikörpern über Chemilumineszenz entsprechend der Herstellerangaben für *Anti-Dig- und Anti-Fluorescein-AP*, *Fab fragments* und *CDP-StarTM* (Boehringer, Mannheim). Durch Exposition eines Röntgenfilms (Kodak X-OMATTM AR, Röntgen Bender, Baden-Baden) mit der eingeschweißten Membran wurde die Akkumulation des Transkriptes durch Schwärzung des Filmes nach dessen Entwicklung sichtbar (Entwickler G 153 A, Schnellfixierbad G 354, Agfa, Röntgen Bender, Baden-Baden).

Für radioaktive *Northern*-Analysen erfolgte die Prähybridisierung der Membran mindestens 30 min in 10 mL 1x Hybridisierungspuffer. Für die Hybridisierung wurde jeweils ein Volumen der Sonde entsprechend ca. 300.000-400.000 cpm mL⁻¹ nach Denaturierung in Hyb-Puffer (5 min bei 90 °C) in einer Hybridisierungsröhre eingesetzt. Anschließend wurde erst 2x 5 min mit 2x SSC, 0,1 % SDS in der Röhre und dann solange mit 0,1x SSC, 0,1 % SDS im Wasserbad bei Hybridisierungstemperatur gewaschen, bis kein radioaktiver Hintergrund mehr mit dem Handmonitor zu detektieren war. Die Membranen wurden in Frischhaltefolie geschlagen oder in Plastikbeutel eingeschweißt und mit einem Röntgenfilm (Kodak X-OMATTM AR, Röntgen Bender, Baden-Baden) oder einem Phosphorscreen (*Kodak Imaging Screen-K*, Bio-Rad, München) exponiert. Die Röntgenfilme wurden nach variabler Expositionszeit entwickelt (s.o.), die Phosphorscreens im Phosphorimager (*Molecular Imager[®] FX*, Bio-Rad, München) ausgelesen und mit dem Programm *Quantity One-4.1.1* (Bio-Rad, München) in einer Auflösung von 200 µm dokumentiert.

- ◆ 5x Hybridisierungspuffer:

1 %	BSA (<i>bovine serum albumin</i>) (w/v)
1 %	Polyvinylpyrrolidon 10-40 kDa (w/v)
1 %	Ficoll 1400000 (w/v)
250 mM	TrisCl pH 7,5 (0,8 M <i>stock</i> -Lösung, autoklaviert)
0,5 %	Tetra-Na-diphosphat-Decahydrat (w/v)
5 %	SDS (sodiumdodecylsulfate) (w/v)
sterilfiltriert (0,45 µm), mit autoklav. A. bidest. auffüllen	
- ◆ 1x Hybridisierungspuffer:

aus 5x Hybridisierungspuffer mit A. bidest. _{DEPC} verdünnt	
0,4 M	NaCl

2.7.2.4 Entfernen von Sonden

Membranen, die bereits mit einer Sonde hybridisiert worden waren, konnten durch *strippen* erneut für eine Hybridisierung mit einer weiteren Sonde verwendet werden. Digoxigenin- oder Fluorescein-markierte Sonden wurden durch Waschen in A. bidest. (1 min bei RT) und anschließende Inkubation der Membranen mit aufgekochtem

0,1 %igem SDS (w/v) (10 min bei RT) mehr oder weniger erfolgreich entfernt. Radioaktiv markierte Sonden wurden durch Waschen in 1 % SDS (w/v), 50 % Formamid (v/v) für 20-40 min bei 80 °C vollständig von den Membranen gelöst.

2.7.2.5 RT-PCR

Um eine möglicherweise für *Northern*-Analysen zu schwache Expression eines Gens nachzuweisen, wurde eine RT-PCR durchgeführt. Dabei wird RNA zuerst in cDNA übersetzt (Reverse Transkription) und in einer anschließenden PCR-Reaktion mit spezifischen Primern die gesuchte cDNA amplifiziert.

Für die einzelnen Reaktionen (25 µL-Ansatz) wurden je 500 ng Gesamt-RNA einer bestimmten Probe, 0,4 mM dNTPs, je 0,6 µM *sense*- und *antisense*-Primer (ORF1, s. 2.8), 10 u RNase-Inhibitor und 1 µL Enzymmix in 1x RT-Puffer (*one step RT-PCR Kit*, Qiagen, Hilden) eingesetzt. Die Anzahl der Zyklen variierte von 23 – 45:

	30 min	50 °C	cDNA-Synthese, reverse Transkription
	15 min	95 °C	Inaktivierung der Reversen Transkriptase, Aktivierung der DNA-Polymerase, Denaturierung der cDNA
x Zyklen	1 min	94 °C	Denaturierung
	1 min	65 °C	Primeranlagerung (<i>annealing</i>)
	1 min	72 °C	Primerverlängerung (DNA-Synthese)
	10 min	72 °C	Komplettierung der DNA-Doppelstränge
	∞	4 °C	Abbruch der Reaktion

Die Produkte wurden mit DNA-Auftragspuffer versetzt und im 1x TBE-Agarosegel mit Ethidiumbromid aufgetrennt (s. 2.6.1).

2.8 ERZEUGUNG EINES *FULL LENGTH*-KLONS

Ausgehend von dem ursprünglich in der SSH identifizierten cDNA-Fragment (s. 2.6) wurden die Enden des Gens in 5'- und 3'-Richtung mittels *RACE* (*rapid amplification of cDNA ends*) entsprechend der Herstellerangaben des *Marathon cDNA Amplification Kit* (Clontech, Heidelberg) erzeugt. Die Methode beruht darauf, dass eine cDNA-Bank durch reverse Transkription aus RNA erstellt wird. An die Enden der möglichst vollständigen cDNAs werden Adapter ligiert, zu denen komplementäre Primer existieren. Ausgehend von dem bekannten cDNA-Fragment wird für jede Richtung (3'- und 5'-Ende) ein Primer abgeleitet, der bei einer Amplifikation in die entsprechende Richtung verlängert wird. In *hot start* PCR-Ansätzen mit jeweils einem nach außen gerichteten genspezifischen und einem Adapter-Primer (AP) sollen dann die Enden der cDNAs hergestellt werden. Die

adapterligierte cDNA-Bank von chemisch induzierten Gerstenpflanzen wurde von Birgit Jarosch, IPAZ Gießen, zur Verfügung gestellt.

Es wurden 5 µL der verdünnten adapterligierten cDNA-Bank mit je 0,2 mM dNTP, 0,2 µM AP1, je 0,2 µM genspezifische *sense*- oder *antisense*-Primer und 1x *Advantage cDNA Polymerase PCR Mix* in 1x *cDNA PCR Reaction Buffer* (Clontech, Heidelberg) für die *touch down* PCR angesetzt:

	30 s	94 °C	Denaturierung
5x	5 s	94 °C	Denaturierung
	4 min	72 °C	Primeranlagerung (<i>annealing</i>)/-verlängerung
5x	5 s	94 °C	Denaturierung
	4 min	70 °C	Primeranlagerung (<i>annealing</i>)/-verlängerung
20x	5 s	94 °C	Denaturierung
	4 min	68 °C	Primeranlagerung (<i>annealing</i>)/-verlängerung
	5 min	68 °C	Komplettierung der DNA-Doppelstränge
	∞	4 °C	Abbruch der Reaktion

◆ *RACE*-Primer (Klon 4-62/*Bci-4*, s. 3.4):

genspezif. Primer <i>nested</i> 1: ngsp1	5'-GCCATCCTTGTTCCGGTCGAAAA-3'
genspezif. Primer 2: gsp2	5'-GTGGATCTTTAGCTGGAAGTGGGGGC-3'
Adapter-Primer 1: AP1	5'-CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC-3'

Die PCR-Produkte wurden nach gelelektrophoretischer Trennung aus dem 1x TBE-Agarosegel mit Ethidiumbromid extrahiert (s. 2.6.1), gemäß Herstellerangaben in den pGEM-T-Vektor ligiert (Promega, Mannheim), in DH α -Zellen (Clontech, Heidelberg) transformiert, und vom Plasmid sequenziert (s. 2.6.4). Aus den Sequenzinformationen wurde ein mögliches offenes Leseraster für die Aminosäuresequenz (*open reading frame*, ORF) abgeleitet.

Mit Hilfe genspezifischer Primer, die den kompletten ORF umspannten und an ihren 5'-Enden Schnittstellen für Restriktionsenzyme (5'-*Bam*HI, 3'-*Hind*III) enthielten, wurde eine unabhängige RT-PCR (*SuperScriptTM One-StepTM RT-PCR System*, GibcoBRLTM Life TechnologiesTM, Karlsruhe) mit 500 ng RNA von BTH-induzierten Pflanzen (s. 2.3.2, 250 mg L⁻¹ gesprüht, 24 hpt) als *template*, je 0,2 µM *sense*- und *antisense*-Primer (s.u.) und 0,5 µl RT/Taq Mix in 1x *Reaction Mix* (GibcoBRLTM Life TechnologiesTM, Karlsruhe) durchgeführt:

	30 min	55 °C	cDNA-Synthese durch reverse Transkription
	2 min	94 °C	Denaturierung des RNA/cDNA Hybrids
25x	15 s	94 °C	Denaturierung
	30 s	65 °C	Primeranlagerung (<i>annealing</i>)
	60 s	72 °C	Primerverlängerung (DNA-Synthese)
	7 min	72 °C	Komplettierung der DNA-Doppelstränge
	∞	4 °C	Abbruch der Reaktion

◆ RT-PCR-Primer (Klon 4-62/*Bci-4*, s. 3.4):

- ORF1 (mit Startcodon)

5'-Ende mit **BamHI**: 5'-TAGGATCCATGCCCCGGTCATCGACAATC-3'

3'-Ende mit **HindIII**: 5'-AAGCTTCTCTCACTCTAAACTAGCACCAAG-3'

- ORF2 (ohne Startcodon)

5'-Ende mit **BamHI**: 5'-TAGGATCCCCCGGTCATCGACAATC-3'

3'-Ende mit **HindIII**: 5'-AAGCTTCTCTCACTCTAAACTAGCACCAAG-3'

Die Produkte wurden nach Gelextraktion und *A-tailing* kloniert, transformiert und die Sequenz überprüft (s. o.).

2.9 HETEROLOGE EXPRESSION IN *E. COLI*

Zur Gewinnung von Antikörpern sollte das rekombinante Protein eines auf Transkriptebene chemisch induzierbaren Gens (*Bci-4*) in einem heterologen bakteriellen Expressionssystem synthetisiert werden. Die rekombinante Proteinexpression wurde mit Hilfe des *QIAexpress system Type IV* nach Herstellerangaben (*The QIAexpressionistTM*, 3rd edition, Qiagen, Hilden) durchgeführt. Der verwendete Vektor besitzt am 5'-Ende vor der *multiple cloning site (MCS)* eine Sequenz, die für sechs aufeinanderfolgende N-terminale Histidin-Reste kodiert (*6xHis-tag*), mit deren Hilfe das synthetisierte Protein anschließend aufgereinigt werden kann (s. 2.9.5; Abb. 2.1).

2.9.1 Klonierungsstrategie

Der Expressionsvektor pQE-30 (Qiagen, Hilden) und der *full length*-Klon (s. 2.8, ORF2) wurden mit denselben Restriktionsenzymen verdaut, so dass der ORF des zu exprimierenden Gens im selben Leseraster wie der *6xHis-tag* in den Vektor ligiert wurde und somit ein funktionales Fusionsprotein entstehen konnte. Dem ORF (ORF2) fehlte das Startcodon, damit sichergestellt war, dass kein Protein ohne *His-tag* entstehen konnte. Für den Restriktionsverdau wurde ein 20 µL-Ansatz mit 1x Restriktionspuffer B, je 10 u *BamHI* und *HindIII* (Boehringer, Mannheim) und 1 µg pQE-30-Vektor bzw. 1,8 µg pGEM-T-ORF2 (s. 2.8, entspricht ca. 340 ng ORF2) 3 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der komplette Verdau mit DNA-Auftragspuffer versetzt und im Agarosegel aufgetrennt (s. 2.6.1), der linearisierte pQE-30-Vektor und das ORF-Fragment aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem *ConcertTM Rapid Gel Extraction System* (GibcoBRLTM Life TechnologiesTM, Karlsruhe) eluiert.

In einem molaren Verhältnis von 20:1 wurde das ORF-Fragment in den pQE-30-Vektor bei 4 °C über Nacht ligiert (10 µL-Ansatz: 1x Ligationspuffer und 3 u T₄-Ligase, Promega, Mannheim). Mit 5 µL des Ligationsansatzes wurden dann kompetente *E. coli* M15-Zellen

(Qiagen, Hilden) nach Herstellerprotokoll transformiert und auf LB-Agarplatten (s. 2.6.1) mit Ampicillin ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) und Kanamycin ($25 \mu\text{g mL}^{-1}$) bei 37°C über Nacht inkubiert. Die gewachsenen Kolonien wurden in einer Kolonie-PCR-Reaktion (s. 2.6.1, 65°C *annealing*-Temperatur) mit genspezifischen Primern (s. 2.8, RT-PCR-Primer) auf das Vorhandensein des ORF getestet, indem Einzelkolonien in A. bidest. aufgenommen, denaturiert ($5 \text{ min } 96^\circ\text{C}$) und zum PCR-Mix zugefügt wurden (s. Abb. 2.1).

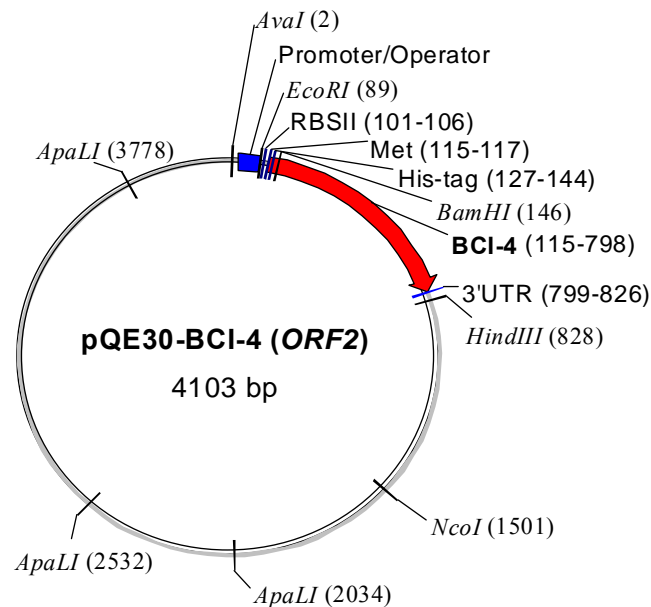


Abb. 2.1 Vektorkarte von pQE30 mit dem ORF von *Bci-4*.

Die Bindung der *E. coli* RNA-Polymerase an den T5 Phage-Promoter wird von zwei lac-Operator-Sequenzen kontrolliert. RBSII: Ribosomenbindestelle, Met: Start der Translation, His-tag: 6 Histidinreste am 5'-Terminus des ORF, BCI-4: ORF von *Bci-4*, 3'-UTR: 3'-terminale untranslatierte Region von *Bci-4*, als bakterieller Selektionsmarker ist das β -Lactamasegen enthalten, das Ampicillinresistenz vermittelt.

2.9.2 Biosynthese des rekombinanten Proteins

Zur Überprüfung der Biosynthese des rekombinanten Proteins wurden Über-Nacht-Vorkulturen (37°C , 1,5 mL Selektionsmedium s. 2.9.1) von vier getesteten Klonen (s. 2.9.1) angesetzt, von denen $600 \mu\text{L}$ für das Animpfen von 12 mL-Hauptkulturen (37°C) verwendet wurden. Bei einer OD_{600} von 0,6 wurden 2 mL als nicht-induzierte Kontrolle (t_0) abgenommen und die restliche Kultur zur Induktion der Proteinbiosynthese mit IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalaktosid, 1 mM Endkonzentration) versetzt. IPTG bindet an den Inhibitor des *lac*-Operons, das *lac*-Repressor Protein, das an die Operatorsequenz des Plasmids bindet und damit die Expression des rekombinanten Gens verhindert. Durch Inaktivierung des *lac*-Repressors bleibt die Operatorsequenz frei und die Wirtszellpolymerase kann die Sequenz *downstream* ihres Promoters transkribieren.

Nachgeschaltete Translation führt zur Synthese des rekombinanten Proteins. Nach 1, 2, 3 und 4 h Schüttelinkubation bei 37 °C wurden jeweils 2 mL der Kultur abgenommen, die Bakterien pelletiert (5 min bei 20800 rcf) und bis zur weiteren Aufarbeitung bei –20 °C gelagert.

Es zeigte sich, dass das rekombinante Protein nicht in der löslichen Fraktion des Zellextraktes vorlag, sondern in der unlöslichen, wahrscheinlich in *inclusion bodies*, akkumuliert. Diese unlöslichen Aggregate fehlgefalteter Proteine akkumulieren intrazellulär und besitzen keine biologische Aktivität (*The Recombinant Protein Handbook*, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg). Zur Herstellung von größeren Proteinmengen wurde daher ein modifiziertes Protokoll angewendet, um die Wahrscheinlichkeit zur Einlagerung des Proteins in *inclusion bodies* zu verringern. Faktoren, die in *E. coli* zur Bildung unlöslicher *inclusion bodies* führen können, sind die Assoziation hydrophober Domänen während der Proteinfaltung, mangelnde Ausbildung von Disulfidbrücken in der reduzierenden Umgebung der Bakterien, das Fehlen von benötigten Cofaktoren, oder ein zu hoher Expressionslevel, so dass das Protein nicht schnell genug richtig gefaltet werden kann (*The QIAexpressionistTM, 3rd edition*, Qiagen, Hilden). Dementsprechend wurde eine 10 mL Über-Nacht-Vorkultur (37 °C, Selektionsmedium s. 2.9.1) zum Animpfen einer 500 mL-Hauptkultur verwendet, die bis zu einer OD₆₀₀ von >0,6 (ca. 1) bei 37 °C geschüttelt wurde. Die Induktion erfolgte dann mit nur 0,5 mM IPTG bei 25 °C, nachdem 2 mL der Kultur als nicht induzierte Kontrolle (t₀) pelletiert und bei –20 °C gelagert wurde. Nach 3 h wurden die Bakterien der restlichen Kultur 20 min bei 4000 rcf und 4 °C pelletiert und bis zur weiteren Aufarbeitung bei –20 °C gelagert.

2.9.3 Extraktion des rekombinanten Proteins

Mittels einer schnellen Aufarbeitungsmethode zur Überprüfung der Proteinexpression wurden die Bakterienpellets (von 2 mL Kultur) in 100 µL TE resuspendiert, Lysozym (Endkonzentration 100 µg mL⁻¹) und 1 u DNase I zugesetzt und 5 min bei RT inkubiert. Nach Einfrieren der Proben in flüssigem Stickstoff wurden sie 30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend 5 min bei 20800 rcf und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand und das Zelltrümmerpellet wurden getrennt bei –20 °C aufbewahrt.

Zur Aufarbeitung unter denaturierenden Bedingungen wurden die Herstellerangaben modifiziert. Das Bakterienpellet (ca. 5 g von 500 mL Kultur) wurde in 10 mL Lysispuffer (8 M Guanidiniumhydrochlorid (GuHCl); 0,1 M NaH₂PO₄; 0,01 M Tris/Cl, pH 8) über 1-2 h resuspendiert, mehrfach in flüssigem Stickstoff eingefroren und wieder aufgetaut, und anschließend zur Erleichterung der Lyse bei 37 °C 30 min lang inkubiert. Durch Zentrifugation (30 min bei 10000 rcf und RT) wurde das Lysat in lösliches Extrakt (Überstand) und eine unlösliche Fraktion (Zelltrümmerpellet) getrennt und beide

Fractionen bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur weiteren Aufreinigung gelagert. Der Überstand wurde vorher mit Puffer (0,1 M NaH_2PO_4 ; 0,01 M Tris/Cl, pH 8) auf eine GuHCl-Konzentration von 6 M verdünnt.

2.9.4 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Proteinkonzentration des Überstandes (s. 2.9.3) wurde nach Bradford (1976) basierend auf einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von *Coomassie Brilliant Blue G-250* von 465 nm zu 595 nm bei Bindung an Proteine in saurer Lösung photometrisch bestimmt. Dazu wurden 900 μL 1x *Bio-Rad Protein Assay* (Bio-Rad, München) mit 100 μL Probenlösung versetzt, 15 min im Dunkeln bei RT inkubiert und die $\text{OD}_{595\text{ nm}}$ (Photometer DU 7400, Beckman, München) der Proben gegen einen *blank*-Wert gemessen. Für die Eichkurve wurden BSA-Konzentrationen von 5, 10, 20, 50 und 75 $\mu\text{g mL}^{-1}$ eingestellt und unter gleichen Bedingungen gemessen. Demnach entsprachen die gemessenen Proteinkonzentrationen BSA-Äquivalenten.

2.9.5 Aufreinigung des rekombinanten Proteins

Vor der Aufreinigung des Proteinextraktes der induzierten Bakterienkultur (s. 2.9.3) wurde ein Aliquot als induzierte Kontrolle ohne weitere Aufreinigung zurückgehalten, um die Effektivität der Aufreinigung überprüfen zu können. Die Aufreinigung erfolgte über eine Ni-NTA-Säule, indem die Histidin-Reste des rekombinanten Proteins an Nickelionen binden, die an einer NTA(*Nitrilotriacetic acid*)-Matrix chelatiert sind. Als Matrix diente in diesem Fall Sepharose[®] CL-6B (Ni-NTA Agarose; Qiagen, Hilden), wobei 1 mL der Matrix mit 4 mL des Proteinextraktes 2 h bei RT gemischt wurde. Anschließend wurde das Matrix-Lysat-Gemisch in eine Säule gepackt und der Durchfluss aufgefangen. Entsprechend der Anleitung wurde die Säule zweimal mit Waschpuffer (8 M Harnsäure; 0,1 M NaH_2PO_4 ; 0,01 M Tris/Cl, pH 6,3; 10 mM Imidazol) gewaschen, bevor das rekombinante Protein eluiert wurde. Die durch die Elutionspuffer (8 M Harnsäure; 0,1 M NaH_2PO_4 ; 0,01 M Tris/Cl, pH 5,9 und 4,5) hervorgerufene pH-Verschiebung führt zur Protonierung und damit zur Verdrängung der gebundenen Aminosäuren (6xHis-tag, pK_a ca. 6,0). Alle Fractionen wurden gesammelt und eine Proteinbestimmung (s. 2.9.4) durchgeführt.

2.9.6 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei zu geringer Konzentration der Proteinextrakte wurden die Proben der schnellen Aufarbeitungsmethode (s. 2.9.3) in 10 %iger (w/v) TCA-Lösung (Trichloressigsäure) auf Eis gefällt, das Pellet zweimal mit eiskaltem Aceton gewaschen (*Protocols and*

Application Guide, 3rd edition, Promega, Mannheim) bzw. die Proben der denaturierenden GuHCl-Aufarbeitung (s. 2.9.5) oder die Pflanzenextrakte (s. 2.10.1) in 5 %iger TCA-Lösung gefällt und einmal mit 100 % Ethanol gewaschen (*The QIAexpressionist*TM, 3rd edition). Die Proteinpellets wurden in 10 µL reduzierendem 1x *Roti*[®]-Load 1-Auftragspuffer (Roth, Karlsruhe) aufgenommen. Die nach der Lyse vom Überstand getrennten Zelltrümmerpellets wurden in TE aufgenommen und 9 µL davon mit 3 µL 4x *Roti-Load 1* versetzt.

Die Proteine beider Fraktionen (Überstand und Zellpellet) wurden nach 5-7 minütiger Denaturierung bei 96 °C im 15 %igem SDS-Polyacrylamidgel (*Protocols and Application Guide*, 3rd edition, Promega, Mannheim) elektrophoretisch bei 100 V in 1x Laufpuffer (Laemmli, 1970) aufgetrennt (Mini-PROTEAN[®]II-Kammer, Bio-Rad, München). Als Proteingroßenstandard diente der *BenchMark*TM *Prestained Protein Ladder* (GibcoBRLTM Life TechnologiesTM, Karlsruhe).

◆ 10x Laufpuffer: 0,25 M Tris, 1,92 M Glycin, 1 % SDS (w/v), autoklaviert
Geringer konzentrierter Puffer wurde aus der *stock*-Lösung entsprechend mit autoklaviertem A. bidest. verdünnt.

2.9.7 Nachweis der Proteinakkumulation

Nach ausreichender Auftrennung der Proteine (s. 2.9.6) wurde das SDS-Polyacrylamidgel über Nacht in einer kolloidalen Coomassie-Lösung (CBBG-250, *Roti*[®]-Blue, Roth, Karlsruhe) gefärbt, die Gelmatrix anschließend in 25 % [v/v] Methanol entfärbt und in 10 % [v/v] Glycerin, 20 % [v/v] Ethanol äquilibriert. Zur vollständigen Trocknung und Aufbewahrung wurde das Gel anschließend zwischen Cellophanfolien (Alba Einmachhaut, Gehring & Neiweiser, Bielefeld) in einen Rahmen (Promega, Mannheim) eingespannt.

2.10 UNTERSUCHUNG DER GENEXPRESSION AUF TRANSLATIONSEBENE

Das aufgereinigte rekombinante Protein (s. 2.9.5) wurde nach Gelelektrophorese (s. 2.9.6) und Coomassie-Färbung (s. 2.9.7) aus dem Gel ausgeschnitten und zur Herstellung von Anti-BCI-4-Antikörpern in Kaninchen (Nr. 8457, 4 *boosts*; Nr. 8458, 3 *boosts*) verwendet (Immunisierungsprogramm DE00471, Eurogentec, Herstal, Belgien). Für den Nachweis des Proteins in (chemisch induzierten) Pflanzen wurde die Akkumulation anschließend in *Western*-Analysen von Proteinextrakten mittels Immunodetektion untersucht.

2.10.1 Proteinextraktion

Für die Herstellung von Proteinextrakt wurde Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff gemörsert, mit dem fünffachen Volumen des Gewichtes mit 1x PBST-Puffer versetzt und homogenisiert. Nach 10-30 min Inkubation auf Eis und gelegentlichem Vortexen wurde das Homogenisat 10 min bei 20800 rcf und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde als Proteinextrakt weiterverwendet und sein Proteingehalt bestimmt (s. 2.9.4). Als weiterer Extrakt wurde interzelluläre Waschflüssigkeit (IWF) aus Primärblättern gewonnen. Dazu wurden Blätter mit Eiswasser (A. dest.) vakuumfiltriert und anschließend 30 min bei 500 rcf und 4 °C zentrifugiert. Die klare IWF wurde nach Bestimmung der Proteinkonzentration (s. 2.9.4) direkt als Proteinextrakt verwendet.

- ◆ 10x PBS: 2,7 mM KCl; 137 mM NaCl; 1,47 mM KH₂PO₄; 7,67 mM Na₂HPO₄;
→ pH 7,4 (mit HCl/NaOH); 0,02 % [w/v] Na-Azid

Geringer konzentrierter PBS-Puffer wurde aus der *stock*-Lösung entsprechend mit autoklaviertem A. bidest. verdünnt.

- ◆ 1x PBST: aus 10x PBS mit autoklaviertem A. bidest. verdünnt; 0,05 % [v/v] Tween20

2.10.2 Western-Analyse

2.10.2.1 Western Blotting

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung (s. 2.9.6) der Proteinextrakte (s. 2.9.5 und 2.10.1) wurde das Gel auf eine PVDF(Polyvinylidendifluorid)-Membran (Trans-Blot[®] Transfer Medium, 0,2 µm, Bio-Rad, München) entsprechend den Herstellerangaben in Towbin-Puffer (25 mM Tris, 192 M Glycin, 20 % [v/v] Methanol) ca. 1 h bei 100 V 'geblottet' (Elektroblot, Mini-PROTEAN[®] II-Kammer, Bio-Rad, München). Die *Blot*kammer wurde in Eis gekühlt und der Puffer im Tank auf einem Magnetrührer gerührt. Nach dem 'Blotten' wurde die Membran 3x 5 min in A. dest. geschwenkt und bis zur Detektion bei 4 °C aufbewahrt.

2.10.2.2 Proteinnachweis mittels polyklonaler Antikörper

Die Immunodetektion des entsprechenden Proteins erfolgte durch Bindung eines sekundären Anti-Kaninchen-Antikörpers an den ersten spezifischen polyklonalen Antikörper aus Kaninchen. Diese Bindung wurde durch die spezifische Reaktion einer an den zweiten Antikörper gekoppelten alkalischen Phosphatase mit einem Substrat (NBT/BCIP) nachgewiesen. Alle Wasch- und Inkubationsschritte erfolgten bei RT: nach 3x 5 min Waschen in 1x PBST-Puffer (s. 2.10.1) wurden freie Bindungsstellen auf der

Membran mit 1 % BSA in 1x PBS abgesättigt und nach 2 h überschüssiges Blockierungsreagenz abgewaschen (s.o.). Nach zweistündiger Inkubation mit dem Präimmun- bzw. Immuns serum (Rohserum, 1:100 in 1x PBS verdünnt) wurden unspezifisch gebundene Antikörper durch erneutes Waschen (s.o.) entfernt. Es folgte die Inkubation mit dem sekundären Anti-Kaninchen-Antikörper aus Ziegen (IgG, 1:1000 in 1x PBS verdünnt, Sigma, Deisenhofen) für 2 h und ein letzter Waschschr itt (s.o.), bevor die Detektion in der Substratlösung (NBT/BCIP) mittels Präzipitation eines blauvioletten Farbstoffes erfolgte. Nach ausreichender Inkubation (einige Minuten) wurde die Reaktion durch Schwenken der Membran in Wasser gestoppt und die Membran anschließend getrocknet.

- ♦ NBT/BCIP-Lösung: SIGMA FAST™ BCIP/NBT *buffered substrate tablet* (Sigma, Deisenhofen)
- oder: 0,15 mg mL⁻¹ NBT (Nitro-Blue-Tetrazolium)
- 0,30 mg mL⁻¹ BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat)
- 5 mM MgCl₂
- 100 mM Tris/Cl pH 9,5
- 150 mM NaCl

2.11 SUBZELLULÄRE LOKALISIERUNG EINES FUSIONSPROTEINS

Zur subzellulären Lokalisation eines Proteins wurde dieses mit dem *green fluorescent protein* (grün fluoreszierendes Protein, GFP) aus der Qualle *Aequorea victoria* fusioniert, indem sein ORF im gleichen Leseraster vor das Reportergen kloniert wurde. Das Fusionsplasmid wurde in Epidermiszellen von Gerstenprimärblättern, von *Arabidopsis*-Blättern und von *Allium cepa* (L.)-Zwiebeln transferiert, um nach Transkription und Translation den Akkumulationsort des fusionierten Proteins über die GFP-Fluoreszenz subzellulär zu bestimmen.

Die transiente Überexpression des Fusionsproteins in Epidermiszellen wurde durch biolistische Transformation erreicht. Dabei handelt es sich um den Beschuss von Zellen intakter Gewebe mit Wolframpartikeln, an die DNA in Form isolierter Plasmide präzipitiert wurde (Schweizer *et al.* 1999).

2.11.1 Klonierungsstrategie

Der ORF des zu lokalisierenden Proteins wurde mit Primern, die entsprechende Restriktionsschnittstellen für eine *in frame*-Klonierung vor die Sequenz von GFP enthalten, in einer PCR-Reaktion amplifiziert (1 µL *template*, 1,5 mM MgCl₂, je 0,2 mM dNTP, je 0,5 µM 5'-*SpeI*-, 3'-*HindIII*-Primer [s.u.] und 0,5 u Taq-Polymerase in 1x PCR-Puffer [Supratherm, Gene Craft, Münster], 35 Zyklen, 58 °C *annealing*-Temperatur). Als

template diente das Plasmid, das den *full length*-Klon (mit anderen Restriktionsschnittstellen) enthielt (s. 2.8, pGEM-T-ORF1).

Das PCR-Produkt wurde durch Gelextraktion aufgereinigt (*Concert™ Rapid Gel Extraction System*, GibcoBRL™ Life Technologies™, Karlsruhe), in den pGEM-T-Vektor ligiert (Promega, Mannheim) und der komplette Ligationsansatz laut Herstellerangaben in DH₅α-Zellen (Clontech, Heidelberg) hitzeschocktransformiert. Mittels Kolonie-PCR (s. 2.6.1, 55 °C *annealing*-Temperatur) mit M13*univers*- und M13*reverse*-Primern (s. 2.6.5) wurden die transformierten *E. coli*-Zellen auf Integration des ORF überprüft, indem Einzelkolonien in A. bidest. aufgenommen, denaturiert (5 min 96 °C) und zum PCR-Mix zugefügt wurden. In Sequenzierreaktionen wurde bestätigt, dass die eingefügten Restriktionsschnittstellen und das *insert* vollständig vorhanden waren und kein *frame shift* oder Basenaustausch vorlag (s. 2.6.4). Mit 3 µg Plasmid wurde ein Restriktionsverdau mit den Enzymen *SpeI* und *HindIII* (je 10 u) in 1x *MultiCore™*-Puffer (Promega, Mannheim) angesetzt (2 h 37 °C), um das ORF-*insert* aus pGEM-T herauszuschneiden. Der pGY1-GFP-Vektor, in den der ORF vor *GFP* fusioniert werden sollte, wurde mit denselben Restriktionsenzymen geschnitten. Dieser modifizierte pUC18-Vektor wurde von Patrick Schweizer, Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung, Gatersleben, zur Verfügung gestellt und enthält *GFPemd-b* (Canberra-Packard Bioscience Company, Dreieich) unter Kontrolle des CaMV-35S-Promoters (Schweizer *et al.* 1999). Die kompletten Restriktionsansätze wurden in einem 1,5 bzw. 0,75 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (s. 2.6.1), die Bande des ORF und des linearisierten pGY1-Vektors (-23 bp) aus dem Gel ausgeschnitten und eluiert (s.o.). Um die Religation des möglicherweise unvollständig (d.h. nur mit einem Restriktionsenzym) geschnittenen Vektors zu verhindern, wurden die 5'-Enden der DNA mit einer alkalischen Phosphatase entsprechend der Herstellerangabe dephosphoryliert (CIAP [*calf intestinal alkaline phosphatase*], GibcoBRL™ Life Technologies™, Karlsruhe). Die Produkte der Restriktion mit *SpeI* und *HindIII* wurden in einem molaren Verhältnis von 1:3 (Vektor zu ORF-*insert*) bei 4 °C über Nacht ligiert (3 u T₄-Ligase, 1x Ligationspuffer, Promega, Mannheim) und anschließend in DH₅α-Zellen (Clontech, Heidelberg) hitzeschocktransformiert (*pGEM-T and pGEM-T Easy Vector Systems Technical Manual*, Promega, Mannheim). Mittels Kolonie-PCR (s. 2.6.1, 58 °C *annealing*-Temperatur) mit je 0,5 µM 5'-*SpeI*-, 3'-*HindIII*-Primer wurden die transformierten *E. coli*-Zellen nach Denaturierung in A. bidest. und Zugabe zum PCR-Mix auf Integration des ORF in den pGY1-Vektor überprüft. In verschiedenen Restriktionsanalysen (2 h bei 37 °C) und anschließender Gelelektrophorese (s.o.) wurde die korrekte Integration des *inserts* in den Vektor nochmals bestätigt (Abb. 2.2).

◆ Fusions-Primer für *Bci-4* ORF1:

5'-Ende mit *SpeI*: 5'-**ACTAGTATGCCCCGGTCATCGACAAT**-3'

3'-Ende mit *HindIII*: 5'-**AAGCTTTTTCGCATAGCACTTTGAAA**-3'

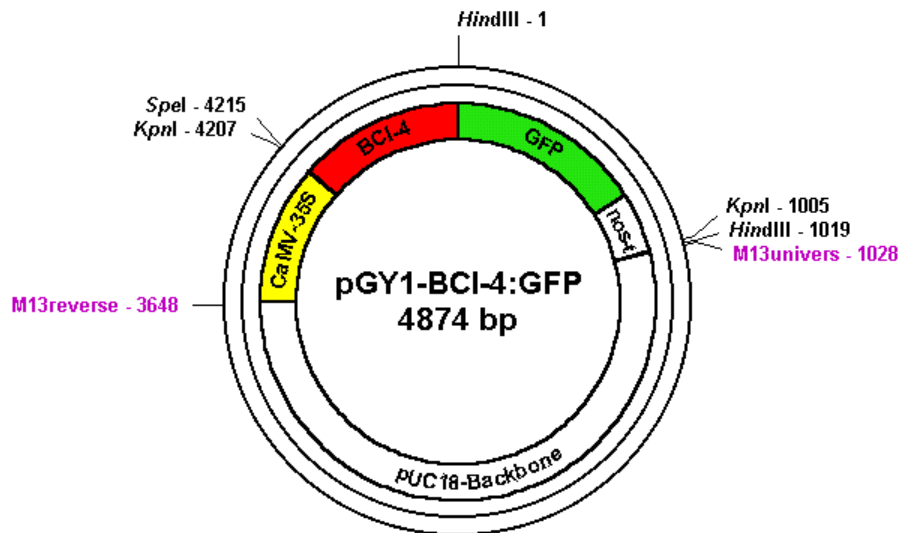


Abb. 2.2 Vektorkarte von pGY1 mit *Bci-4:GFP*.

Der ORF von *Bci-4* (BCI-4) wurde in den pGY1-Vektor (pUC18-backbone) *in frame* vor die Sequenz von *GFPemv-b* (GFP) kloniert und steht unter Kontrolle des konstitutiven CaMV-35S-Promoters. Als bakterieller Selektionsmarker ist das β -Lactamasegen enthalten, das Ampicillinresistenz vermittelt. nos-t: Transkriptionsterminator des bakteriellen Nopalinsynthasegens.

2.11.2 Transiente Transformation

Es wurden ca. 4 cm lange Segmente von Gerstenprimärblättern, Rosettenblätter von *Arabidopsis thaliana* und Zwiebelepidermen von *Allium cepa* (L.) verwendet. Die verschiedenen Gewebe wurden auf 0,5 % Phytagar (GibcoBRL™ Life Technologies™, Karlsruhe) mit 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Benzimidazol in Petrischalen (6,5 cm Ø) gelegt und direkt vor dem Partikelbeschuss an den Rändern mit einer Schablone mit einer rechteckigen Aussparung von 2,2 cm x 2,3 cm abgedeckt. Die Schalen wurden nacheinander auf den Boden der Vakuumkammer (Schweizer *et al.* 1999) gestellt, über dem ein Nylonnetz (Maschenweite 0,2 mm, Millipore, Eschborn) als Diffusor auf einer Lochplatte eingeschoben war (5 cm über dem Boden, 11 cm unterhalb des *Macrocarriers*, s.u.), um

Partikelklumpen zu zerstreuen und den Partikelstrom abzubremsen. Der oben an der Kammer angebrachte *Macrocarrier* (Plastik-Sterilfilterhalter, 13 mm, Gelman Sciences, Swinney, UK) wurde je Schuss mit 5,8 μL DNA-beschichteten Wolframpartikeln (*Microcarrier*, s.u.) beladen. Mit einer Membranvakuumpumpe (Vacuubrand, Wertheim) wurde der Druck um 0,9 bar in der Kammer reduziert und die Wolframpartikel mit 9 bar Heliumgasdruck auf die Oberfläche des Pflanzengewebes geschossen. Sofort danach wurde die Kammer belüftet. Für die Lokalisation wurden die Blätter bzw. Zwiebelepidermen mit dem Fusionsplasmid (pGY1-Bci-4:GFP) beschossen. Zum Vergleich wurden Zellen mit pGY1-GFP (cytoplasmatische Akkumulation von GFP, s. 2.11.1) bzw. mit pBIN-m-GFP5-ER (Haseloff, Cambridge, UK) beschossen. Die Sequenz von *m-GFP5-ER* enthält einige Modifikationen, die eine Expression in *Arabidopsis* verbessern und GFP im Endoplasmatischen Retikulum (ER) kompartmentieren sollen. Die Kompartimentierung im ER wird durch ein N-terminales Signalpeptid einer basischen Chitinase von *A. th.* und eine C-terminale HDEL-Sequenz erreicht. Der Vektor pBIN-m-GFP5-ER wurde von Jafargholi Imani, Institut für Pflanzenernährung, JLU Gießen, zur Verfügung gestellt. Vor dem Schießen eines anderen Plasmids wurde der *Macrocarrier* jeweils gründlich mit Wasser gereinigt. Nach dem Beschuss wurden die Blätter bzw. Epidermen in leicht geöffneten Petrischalen bei RT über Nacht inkubiert.

- ◆ *Microcarrier*-Präparation: 55 mg Wolframpartikel M 17 1,1 μm Ø (Bio-Rad, München)
 2x mit 1 mL autoklaviertem A. bidest. waschen
 1x mit 1 mL 100 %igem Ethanol waschen
 trocknen und in 1 mL 50 %igem Glycerin aufnehmen
 $\Rightarrow 50 \text{ mg mL}^{-1}$ (*stock-Lösung*)
 mit 50 %igem Glycerin auf 25 mg mL^{-1} verdünnen

Vor Gebrauch gut mischen und im Ultraschallbad suspendieren.

- ◆ *Microcarrier*-Beschichtung: 0,35-1 μg Plasmid (1 μL)
 (alle Angaben pro Schuss) 12,5 μL Wolframpartikel (s.o., 25 mg mL^{-1})
 12,5 μL 1 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, pH 10,
 tropfenweise unter ständigem Mischen zugeben
 10 min bei RT stehenlassen
 kurz zentrifugieren
 20 μL vom Überstand abnehmen
 Rest resuspendieren (Ultraschallbad)

2.11.3 Nachweis des Fusionsproteins

Die GFP-Fluoreszenz des Fusionsproteins wurde zuerst im Auflichtfluoreszenzmikroskop (Zeiss Axioplan, Göttingen s. 2.4) durch Fluoreszenzanregung mittels einer Quecksilberhochdrucklampe (HBO 50 W, Osram) unter Verwendung eines Erregerfilters (485 nm), eines Farbteilers (510 nm) und eines Langpassfilters (520 nm) bei 250-facher

Vergrößerung mit Wasserimmersion direkt auf dem Blatt ausgewertet. Zur Dokumentation wurde hier eine digitale Kamera (AxioCam, Zeiss, Göttingen) und das Programm AxioVision 2.0.5. (Zeiss, Göttingen) verwendet. Um eine detailliertere Aussage über die Lokalisation treffen zu können, wurde ein konfokales Laserscanning-Mikroskop (TCS 4D, Leica, Heidelberg) der Arbeitsgruppe von Aart van Bel, Institut für Botanik I, JLU Gießen, eingesetzt. Die Anregung der GFP-Fluoreszenz erfolgte bei einer Wellenlänge von 488 nm (75 mW Argon/Krypton Laser, Omnicrome, Chino, USA) unter Verwendung eines 510 nm Langpassfilters. Die Auswertung wurde mit 200-facher oder 630-facher (Ölimmersion) Vergrößerung durchgeführt.

2.12 NACHWEIS EINER GENFUNKTION

Um die Bedeutung eines Genproduktes für die Induzierte Resistenz zu zeigen, sollte seine Funktion durch transiente Überexpression des Gens in Epidermiszellen von Primärblättern einer anfälligen Gerstensorte nachgewiesen werden. Durch nachfolgende Inokulation der transformierten Blätter mit dem Echten Gerstenmehltaupilz und Untersuchung der Interaktion konnte der Einfluss auf die Resistenz beurteilt werden. Die transiente Transformation erfolgte wie unter 2.11 beschrieben durch Partikelbeschuss, jedoch als Cotransformation des entsprechenden Gens mit einem Reportergen (Schweizer *et al.* 1999). Die Rate der Coexpression zweier gemeinsam in Gerstenepidermiszellen geschossener Gene liegt bei ca. 70 % (Schweizer *et al.* 1999).

2.12.1 Klonierungsstrategie

Der ORF des Gens, das überexprimiert werden sollte, wurde in die MCS des pGY1-Vektors kloniert (s. 2.11, Schweizer *et al.* 1999). Dazu wurde der *full length*-Klon (s. 2.8, ORF1 und ORF2) mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Pst*I aus pGEM-T in 1x *Reaction Buffer H* (Boehringer, Mannheim) herausgeschnitten (2 h 37 °C) und dann über diese Restriktionsenzyme in den linearisierten pGY1-Vektor (gleicher Restriktionsverdau) hinter den CaMV-35S-Promoter kloniert (3 u T4-Ligase in 1x Ligationspuffer [Promega, Mannheim] bei 4 °C über Nacht). Nach Transformation in DH α -Zellen (Clontech, Heidelberg) wurden Plasmide von Einzelkolonien einer Restriktionsanalyse zur Überprüfung der Klonierung unterzogen (s.o.).

2.12.2 Transiente Transformation

Die transiente Überexpression erfolgte für die Funktionsanalyse mit Primärblättern sieben Tage alter Gerstenpflanzen, die von der Spitze auf ca. 4 cm lange Segmente zugeschnitten

wurden. In einem Ansatz wurden mindestens 10 Petrischalen à 4 Blattsegmente mit 0,7 µg des zu überexprimierenden Gens und 0,3 µg eines entsprechenden Reportergens (*Uida* für β -Glucuronidase [GUS] oder *GFP* für grün fluoreszierendes Protein) beschossen. Die Vorbereitung der Wolframpartikel und der Beschuss erfolgte wie unter 2.11.2 beschrieben. Das Plasmid mit dem Reportergen *GFP* unter Kontrolle des CaMV-35S-Promoters (pGY1-GFP, s. 2.11.1), sowie ein Konstrukt mit dem Reportergen *Uida* unter Kontrolle eines Ubiquitinpromoters (Schweizer *et al.* 1999), wurde von Patrick Schweizer, Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung, Gatersleben, zur Verfügung gestellt. Zur Kontrolle der Funktionsanalyse wurden die Vektoren mit den Reportergenen alleine geschossen.

Nach vierstündiger Inkubation nach dem Beschuss bei leicht geöffneten Petrischalen, RT und Tageslicht wurden die Blätter mit 25-170 Konidien mm⁻² des Echten Mehltaupilzes der Rasse A6 inokuliert und für weitere 40-48 h unter gleichen Bedingungen inkubiert.

2.12.3 Nachweis transformierter Zellen

Bei Cotransformation von *GFP* als Reporter erfolgte die Auswertung im Auflichtfluoreszenzmikroskop wie unter 2.11.3 beschrieben zwei Tage nach Inokulation der transformierten Blätter. Bei Cotransformation von *Uida* als Reporter wurden die beschossenen Blattsegmente zwei Tage nach der Inokulation mit einem synthetischen Substrat der β -Glucuronidase vakuumfiltriert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. In transformierten Zellen akkumuliert daraufhin ein blaugrüner Farbstoff. Die Substratlösung (Schweizer *et al.* 1999) wurde von Holger Schultheiss, IPAZ, Gießen, in der Art optimiert, dass einzelne transformierte Zellen auf dem Blatt gut lokalisierbar waren und die Färbung nur begrenzt in Nachbarzellen diffundieren konnte. Nach der Inkubation mit Substrat wurden die Blätter wie unter 2.4 beschrieben entfärbt und in 50 %igem Glycerin aufbewahrt.

◆ Substratlösung:	1 mg mL ⁻¹	x-Gluc (5-Bromo-4-chloroyl-3-indoxyl- β -D-glucuronsäure, Cyclohexylammonium-Salz)
	20 % (v/v)	Methanol
	10 mM	Na-EDTA, pH 8
	100 mM	Na-Phosphat, pH 6,5
		A. bidest.
	2 mM	Kaliumhexacyanoferrat II Trihydrat
	2 mM	Kaliumhexacyanoferrat III
	0,1 % (v/v)	Triton X-100, unter ständigem Rühren zufügen
	Substanzen in aufgeführter Reihenfolge zusammen geben, auf pH 7 einstellen und bei -20 °C lagern	

2.12.4 Mikroskopische Auswertung der Überexpression

Für die Auswertung der Interaktion von *Blumeria graminis* mit den transformierten Wirtszellen wurden die Pilzstrukturen bei Coexpression von GUS in essigsaurer Tinte angefärbt und die Präparate im Durchlicht mikroskopiert (s. 2.4). Bei Coexpression von GFP erfolgte die Auswertung ohne Entfärben der Blätter oder Anfärbung des Pilzes, da dies zur Inhibierung der GFP-Fluoreszenz führt, unter Fluoreszenzanregung bei 250-facher Vergrößerung mit Wasserimmersion direkt auf dem Blatt.

Bedingt durch die hohe Inokulumsdichte, die sicherstellen sollte, dass bei der relativ geringen Zahl transformierter Zellen (GUS: 1-2 pro Blatt, GFP: ca. 10 pro Blatt) mindestens eine Konidie auf einer transformierte Zelle landete, befanden sich oftmals mehrere ausgekeimte Konidien auf einer Zelle. In die Auswertung ging jedoch nur die Anzahl der attackierten Zellen mit einem erfolgreich etablierten Haustorium im Verhältnis zu der Zahl attackierter Zellen ohne Haustorium ein (Penetrationsrate), unabhängig davon, wie viele Penetrationsversuche zusätzlich abgewehrt wurden (Papillenbildung) oder erfolgreich waren (mehrere Haustorien in einer Zelle).

3 ERGEBNISSE

3.1 INDUKTION DER RESISTENZ VON GERSTE GEGENÜBER *BLUMERIA GRAMINIS* F.SP. *HORDEI*

3.1.1 Cytologische Untersuchung der chemisch Induzierten Resistenz (cIR)

Das Prinzip der chemisch Induzierten Resistenz (cIR) beruht auf Applikation von synthetischen Resistenzinduktoren wie 2,6-Dichlorisonikotinsäure (DCINA, CGA41396, Ciba-Geigy, jetzt Syngenta, Basel, Schweiz) und Benzo(1,2,3)thiadiazol-7-carbothionsäure-*S*-methylester (BTH, auch Azibenzolar, CGA245704, Bion[®], Ciba-Geigy, jetzt Syngenta, Basel, Schweiz), die systemisch in der Pflanze transportiert werden und einen Zustand erhöhter Abwehrbereitschaft erzeugen. Es wurden verschiedene Versuche zur Resistenzinduktion gegenüber dem Echten Gerstenmehltaupilz *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* (*Bgh*) mit Hilfe der Induktoren DCINA und BTH durchgeführt. Als Wirtspflanze diente dabei die suszeptible Gerstensorte Manchuria, die kein bekanntes Resistenzgen gegen *Bgh* besitzt. Nach Entwicklung des Primärblattes wurden die Keimlinge mit 125 mg L⁻¹ BTH besprüht bzw. mit 10 mg L⁻¹ DCINA bezogen auf das Bodenvolumen gegossen. Eine entsprechende Applikation der Leerformulierung (*wettable powder*, WP) diente als Kontrolle. Drei Tage später wurden die Primärblätter mit *Bgh* der Rasse A6 (*Bgh*A6) inokuliert, 48 Stunden danach (48 hpi, *hours post inoculation*) geerntet und der Interaktionsphänotyp von Wirt und Pathogen auf dem Blatt mikroskopiert.

Beide Induktoren bewirkten eine erhöhte Penetrationsresistenz der Epidermiszellen gegenüber dem Pilz und damit eine Reduktion der Anzahl der Zellen mit etablierten Haustorien (Hau) bzw. der Anzahl der Pilze mit Sekundärmycel (ESH, *elongating secondary hyphae*) um ca. 37 % (BTH) bzw. 39 % (DCINA) (Abb. 3.1). Die Mittelwerte der Interaktionsstellen mit Hau/ESH waren sowohl nach BTH- als auch nach DCINA-Applikation signifikant ($p \leq 0,001$) von den Kontrollen verschieden (einseitiger T-Test). Während sich bei der BTH-Behandlung sowohl die Anzahl der effektiven Papillen (Pap_{eff}) als auch der Papillen in Kombination mit einer Hypersensitiven Reaktion (Pap_{eff}+HR) der Epidermiszelle als Abwehrmechanismen gegen pilzliche Penetrationsversuche im Vergleich zur Kontrolle in etwa verdoppelt hatte, zeigte sich nach DCINA-Behandlung ein anderes Bild. Hier war die Anzahl der durch Papille und HR erfolgreich abgewehrter Infektionsversuche deutlich stärker erhöht als die Zahl der Interaktionen, die alleine durch

die Bildung einer effektiven Papille gestoppt wurden. Insgesamt überwog jedoch die Abwehr des Pathogens durch eine Papillenbildung ohne Zelltod bei beiden Resistenzinduktoren.

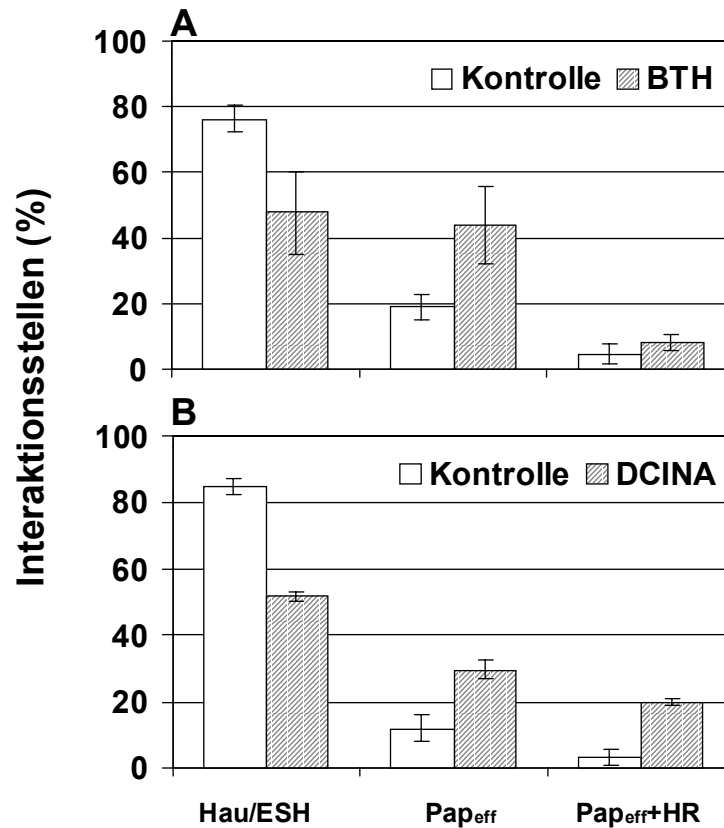


Abb. 3.1 Abwehrreaktionen chemisch induzierter Primärblätter von Gerste cv. Manchuria gegenüber dem Echten Gerstenmehltaupilz *BghA6*.

A Sechs Tage alte Keimlinge wurden mit 125 mg L^{-1} BTH bzw. als Kontrolle mit der Leerformulierung (WP) besprüht und drei Tage später mit *BghA6* inokuliert. Die Säulen repräsentieren Mittelwerte von je 5 Blättern einer Behandlungsvariante. Es gingen insgesamt 362 (WP) bzw. 638 (BTH) Interaktionsstellen in die Auswertung ein. **B** Fünf Tage alte Keimlinge wurden mit 10 mg L^{-1} DCINA bezogen auf das Bodenvolumen bzw. als Kontrolle mit der Leerformulierung (WP) gegossen und drei Tage später mit *BghA6* inokuliert. Die Säulen repräsentieren Mittelwerte von je 3 Blättern einer Behandlungsvariante. Es gingen insgesamt 562 (WP) bzw. 787 (DCINA) Interaktionsstellen in die Auswertung ein.

Die Auswertung nach 48 hpi erfolgte durch Auszählen der Interaktionsstellen mit etablierten Haustorien (Hau) bzw. Bildung von Sekundärmycel (ESH), Bildung effektiver Papillen (Pap_{eff}) und Bildung effektiver Papillen mit zusätzlicher HR der attackierten Epidermiszelle (Pap_{eff}+HR). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Parallelen an. Eine unabhängige Reproduktion führte zu ähnlichen Ergebnissen.

3.1.2 Überprüfung der Wirkung potentieller Resistenzinduktoren

3.1.2.1 *Blumeria graminis* f.sp. *tritici* als potentieller biotischer Resistenzinduktor

Das Phänomen der biotisch Induzierten Resistenz (bIR), beruht auf dem Kontakt eines Organismus (*inducer*) mit der Pflanze, der dazu führt, dass die Pflanze den nachfolgenden Angriff eines virulenten Pathogens (*challenger*) abwehren kann. Es wurde der Effekt einer Präinokulation mit dem Echten Weizenmehltaupilz (*Blumeria graminis* f.sp. *tritici*, *Bgt*) auf die Interaktion von Gerste mit *Bgh* untersucht. Der Echte Weizenmehltaupilz ist nahezu ein Nicht-Wirt-Pathogen von Gerste, d.h. er kann Gerstenblätter normalerweise nicht besiedeln, da seine Entwicklung durch entsprechende Abwehrmechanismen verhindert wird. Eine mehrfach beschriebene Resistenzinduktion (Thordal-Christensen & Smedegård-Petersen 1988, Ouchi *et al.* 1976) gegenüber *Bgh* sollte für eine hochanfällige Gerstensorte überprüft werden.

Vollständig entwickelte Gerstenprimärblätter cv. Manchuria wurden zunächst mit Konidien des Echten Weizenmehltaupilzes und anschließend 1, 2 oder 4 Tage später mit Konidien von *BghA6* inokuliert. Je sieben Tage nach der *challenge*-Inokulation wurde der Befall makroskopisch durch visuelles Abschätzen von Befallsunterschieden auf den Blättern bonitiert. In sieben unabhängigen Versuchen wurde in der hochanfälligen Sorte Manchuria keine resistenzinduzierende Wirkung von *Bgt* gegenüber *Bgh* festgestellt. In je einem Experiment wurde der Mehлтаubefall zusätzlich durch Auszählen von Pusteln (Abb. 3.2 A) bzw. durch mikroskopische Analyse der Interaktionsstellen (Abb. 3.2 B) überprüft. Als positiv-Kontrolle für eine generelle Induzierbarkeit der Pflanzen wurden parallele Proben mit BTH bzw. DCINA chemisch induziert und vier Tage danach *challenge*-inokuliert. Durch Auszählen und Vergleich der Mehлтаupusteln von Kontrollen und chemisch induzierten Blättern wurde die Befallsreduktion bestimmt.

Durch Auszählen sowohl der Pusteln (Binokular) als auch der erfolgreichen Penetrationsereignisse (Mikroskop) des Echten Gerstenmehltaupilzes nach Präinokulation mit *Bgt* wurde der visuelle Eindruck des Fehlens einer erhöhten Resistenz der präinokulierten Pflanzenproben bestätigt. Die Anzahl der Mehлтаupusteln pro Blattsegment war sogar signifikant größer bei präinokulierten im Vergleich zu Kontrollpflanzen, unabhängig von der Induktionszeit von ein ($p \leq 0,01$) bzw. vier ($p \leq 0,001$) Tagen, die bis zur *challenge*-Inokulation verging (zweiseitiger T-Test, Abb. 3.2 A). Auf Blättern, die nur mit dem Weizenmehltau Pilz inokuliert worden waren, wurde makroskopisch keine Pustelbildung beobachtet. Die parallel geführte chemische Induktion mit DCINA führte dagegen zu einer Reduktion der Pustelzahl (Daten nicht gezeigt).

In der cytologischen Analyse wurde nur die Anzahl der erfolgreich durch *Bgh* besiedelten Zellen mit ESH-Bildung pro 1 cm Blattlänge bestimmt, da die abgewehrten Penetrationsversuche von *Bgt*, die im Mikroskop nicht von denen durch *Bgh* verursachten

zu unterscheiden sind, die Verhältnisse von erfolgreichen und gestoppten Infektionsstellen verschoben hätten. Auch hier zeigte sich, dass eine Präinokulation mit *Bgt* nicht zu einer erhöhten Resistenz und damit weniger ESH führte, sondern die Anzahl der erfolgreichen Penetrationsereignisse und die Bildung von ESH signifikant erhöht war ($p \leq 0,001$; zweiseitiger T-Test, Abb. 3.2 B). Die parallel geführte chemische Induktion mit BTH führte dagegen zu einer Reduktion der Pustelzahl (visuelle Abschätzung) und Bildung von ESH (s. Abb. 3.1 A).

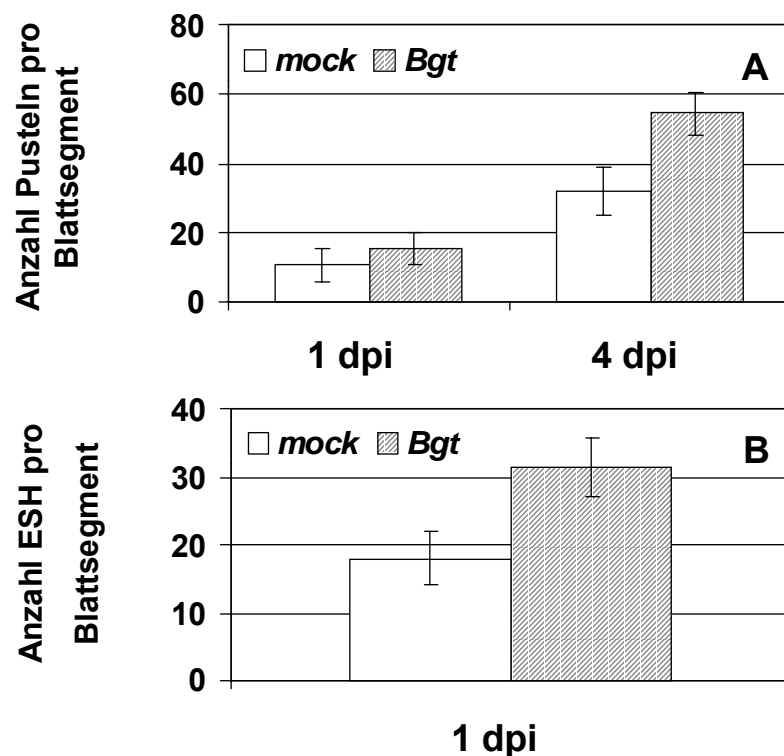


Abb. 3.2 Präinokulation von Gerste cv. Manchuria mit *Blumeria graminis* f.sp. *tritici* und nachfolgende *challenge*-Inokulation mit *BghA6*.

Sieben Tage alte Keimlinge wurden in zwei unabhängigen Versuchen (A und B) mit *Bgt* bzw. als Kontrolle *mock* (Schein)-präinokuliert. Einen oder vier Tage (A), bzw. einen Tag (B) danach (1 bzw. 4 dpi, *days post inoculation*) wurden die Primärblätter mit *BghA6* inokuliert. **A** Sieben Tage nach der *challenge*-Inokulation wurden die Mehltaupusteln auf der adaxialen Blattspreite 6 cm langer Blattsegmente gezählt. Säulen repräsentieren Mittelwerte von 15 Blättern (*challenge* 1 Tag nach Induktion mit 0,5 Konidien mm^{-2}) bzw. von 5 Blättern (*challenge* 4 Tage nach Induktion mit 1 Konidie mm^{-2}) einer Behandlungsvariante. **B** Die cytologische Auswertung erfolgte 48 h nach der *challenge*-Inokulation durch Auszählen der Interaktionsstellen auf 1 cm langen Blattsegmenten. Säulen repräsentieren Mittelwerte der Anzahl an Interaktionsstellen mit Sekundärmycel (ESH) von 5 Blättern. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Parallelen an.

3.1.2.2 Vergleichende Analyse der Wirksamkeit chemischer Resistenz-induktoren

Die systemisch Induzierte Resistenz (sIR) bewirkt einen systemischen Schutz der gesamten Pflanze, also auch der Pflanzenteile, die nicht direkt mit dem Induktor in Kontakt standen. Salicylsäure (SA) ist ursächlich an der Ausprägung einer Form der sIR (SAR) beteiligt und kann bei Applikation die gleichen Resistenzreaktionen hervorrufen (s. Einleitung). Die synthetischen Resistenzinduktoren DCINA und BTH sind strukturelle und funktionelle Analoga der SA. Die Wirkung dieser drei chemischen Induktoren wurde für das Gerste-Mehltau System vergleichend dargestellt.

Die Induktorwirkung sollte an zwei Gerstenlinien (cv. Ingrid und Mutante A89) untersucht werden. Dazu wurden fünf Tage alte Keimlinge mit jeweils zwei Konzentrationen der verschiedenen Chemikalien gegossen. Als Kontrolle zur SA- und DCINA-Behandlung wurden die Pflanzen mit 1 %iger DMF-Lösung, als Kontrolle zur BTH-Behandlung mit der Leerformulierung (*wettable powder*, WP) gegossen. Vier Tage nach der Induktion erfolgte die *challenge*-Inokulation mit *BghA6*, die bei der moderat suszeptiblen Mutante A89 mit mehr Inokulum durchgeführt wurde, um einen deutlichen Resistenzbruch (d.h. Pustelbildung auf den Kontrollpflanzen) beobachten zu können.

Nach Auszählen der Mehltapusteln auf Blattsegmenten 7 dpi (*days post inoculation*) zeigte sich, dass SA unabhängig von der Applikationsmenge in beiden Genotypen zu einer Reduktion des Mehltaubefalls um ca. 20 % führte (Abb. 3.3a und 3.3b). Demgegenüber war das Induktionspotential von DCINA und BTH deutlich größer, und zudem dosisabhängig. Die Mutante A89 reagierte mit einer Befallsreduktion von 75 bzw. 84 % stärker auf DCINA als cv. Ingrid mit 34 bzw. 60 % Reduktion (Abb. 3.3a und 3.3b). Mit BTH konnte die Pustelzahl auf 80 bzw. 90 % im Vergleich zur Kontrolle gesenkt werden, wobei Ingrid empfindlicher auf die geringere BTH-Menge reagierte (Abb. 3.3a und 3.3b). Trotz stärkerer Inokulation von A89 konnten sich insgesamt um 30 % weniger Mehltaukolonien auf dem Primärblatt etablieren als bei den Wildtyppflanzen Ingrid, nach DCINA-Behandlung sogar um 70 % weniger (nicht abgebildet). Diese Unterschiede zwischen den Genotypen bezüglich der DCINA-Induzierbarkeit sind mehrfach reproduziert, ebenso wie die schwache Wirkung von SA, die zudem von Experiment zu Experiment schwankt.

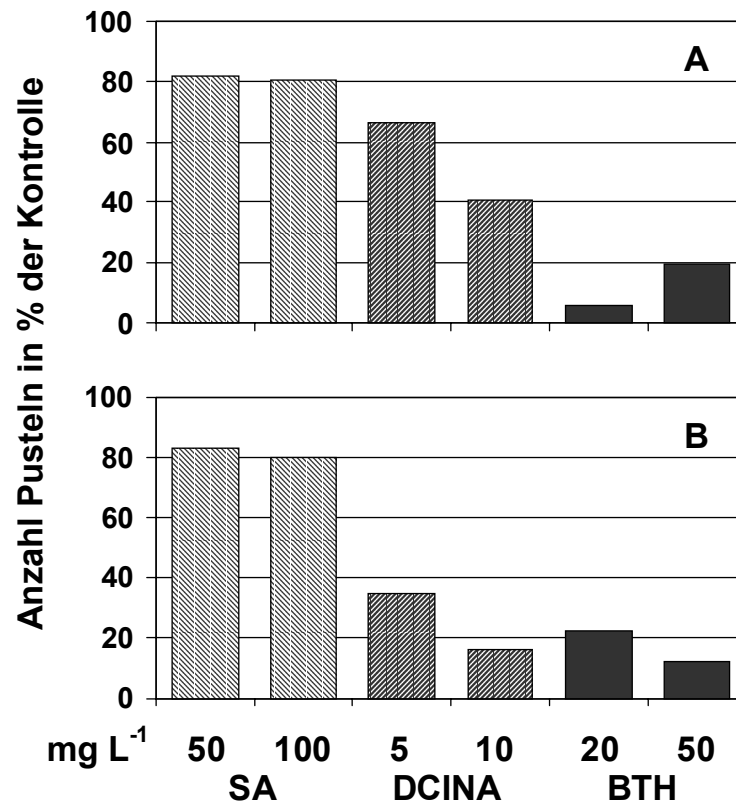


Abb. 3.3a Chemische Resistenzinduktion mit SA, DCINA und BTH in Gerste gegen *BghA6*.

Fünf Tage alte Keimlinge cv. Ingrid (A) bzw. der Mutante A89 (B) wurden mit den angegebenen Konzentrationen (mg L⁻¹) der chemischen Induktoren jeweils bezogen auf das Bodenvolumen gegossen und vier Tage danach mit *BghA6* inokuliert. Kontrollbehandlung erfolgte durch Gießen einer 1 %igen DMF- (SA, DCINA) bzw. WP-Lösung (BTH). Die Mehltaupusteln wurden 7 dpi auf der adaxialen Blattspreite 6 cm langer Blattsegmente gezählt. Die Säulen repräsentieren Mittelwerte der Pustelzahl pro Blattsegment von je 20 Blättern einer Behandlungsvariante (aus 4 Töpfen) in % der jeweiligen Kontrolle.

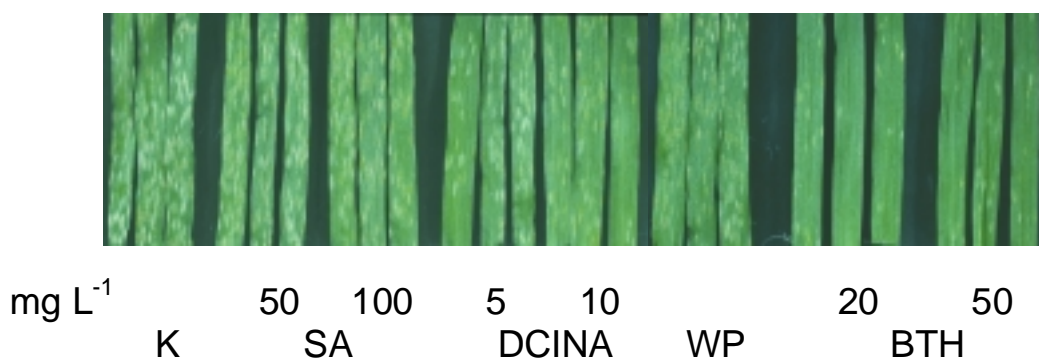


Abb. 3.3b Erscheinungsbild chemisch induzierter Gerste nach Inokulation mit *BghA6*.

Fünf Tage alte Keimlinge cv. Ingrid wurden mit den angegebenen Konzentrationen (mg L⁻¹) der chemischen Induktoren jeweils bezogen auf das Bodenvolumen gegossen und vier Tage danach mit *BghA6* inokuliert. Kontrollbehandlung für SA und DCINA erfolgte durch Gießen einer 1 %igen DMF-Lösung (K), für BTH durch Gießen der Leerformulierung (WP). Aufnahme des Schadbildes 7 dpi.

3.1.2.3 Einfluss von Abscisinsäure auf die Ausprägung der Resistenz

Für die Induzierte Resistenz werden unterschiedliche Signalwege diskutiert, die in unterschiedlichen Pathosystemen wirksam sind. Komponenten oder Intermediate der jeweiligen Signaltransduktionskette können Phytohormone sein, die möglicherweise auch durch exogene Applikation Resistenz induzieren. Die Wirkung von Jasmonat auf die Interaktion von Gerste mit *Bgh* wurde bereits früher untersucht, wobei kein resistenzinduzierender Effekt nachgewiesen werden konnte (Kogel *et al.* 1995). Hier wurde ein Experiment mit Abscisinsäure (ABA) als möglicher Induktor von Resistenz durchgeführt. Dazu wurden Primärblätter fünf Tage alter Gerstenpflanzen cv. Ingrid mit 50 μ M ABA-Lösung, Kontrollpflanzen mit Wasser besprüht. Ein Tag nach der Behandlung wurden die Pflanzen mit *BghA6* inokuliert und 7 dpi danach die Zahl der Mehltaupusteln auf den Primärblättern bestimmt. Es konnte keine resistenzinduzierende Wirkung von ABA gegenüber *Bgh* beobachtet werden (ohne Abbildung).

3.1.2.4 Einfluss einer mechanischen Verwundung auf die Ausprägung der Resistenz

Da die Signalwege verschiedener Stressfaktoren miteinander interagieren oder an verschiedenen Punkten zusammenlaufen können, wurde eine mögliche Kreuzinduktion (*cross induction*) von Verwundungsantwort und Resistenz gegen den Echten Gerstenmehltaupilz überprüft. Primärblätter sieben Tage alter Gerstenkeimlinge cv. Ingrid wurden dazu mit Nadeln durchlöchert und drei Tage danach mit *BghA6* inokuliert. Die Mehltaupusteln wurden 7 dpi auf den Blättern gezählt und mit unbehandelten Kontrollen verglichen. Es konnte keine resistenzinduzierende Wirkung der Wundverletzung gegen *Bgh* beobachtet werden (ohne Abbildung).

3.2 IDENTIFIZIERUNG NACH CHEMISCHER INDUKTION DIFFERENTIELL EXPRIMIERTER GERSTENGENE

Zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene standen 480 Klone einer subtrahierten cDNA-Bank aus chemisch induzierter Gerste zur Verfügung (s. 2.5). Zunächst wurden die Klone selektiert, die ein cDNA-Fragment ≥ 100 bp Länge enthielten (342 Klone). Nach einer ersten *Reversed Northern*-Analyse zeigten 50 dieser Klone ein differentielles Signal nach Hybridisierung mit Sonden von chemisch induzierten Gerstenblättern bzw. von deren Kontrollen. Das Ergebnis für 39 dieser Klone in einer zweiten *Reversed Northern*-Analyse ist in Abbildung 3.4 dargestellt (11 Klone lieferten nicht mehr das erwartete Amplifikationsprodukt).

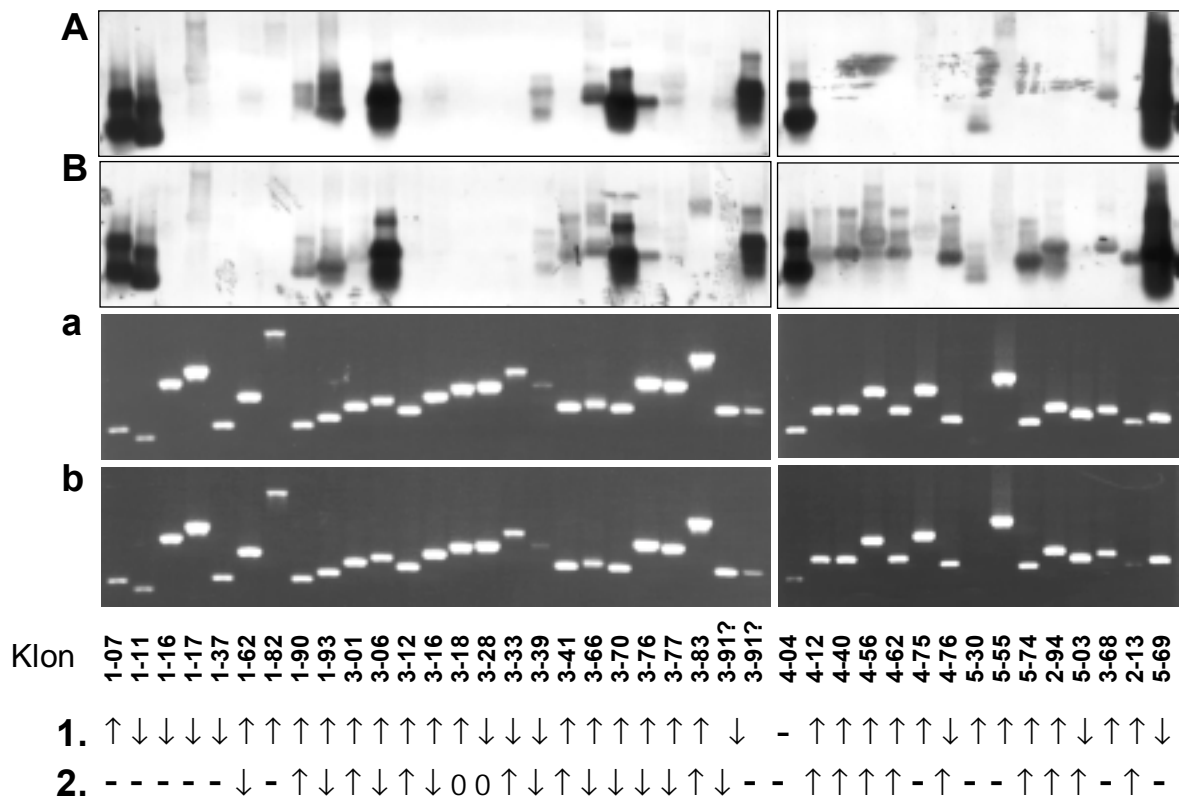


Abb. 3.4 Zweite *Reversed Northern*-Analyse von cDNA-Klonen potentiell DCINA-induzierter Gene.

a, b Kolonie-PCR-Amplifikate subtrahierter potentiell differentieller cDNA-Klone wurden nach gelelektrophoretischer Trennung durch Ethidiumbromid(EtBr⁻)-vermittelte Fluoreszenz unter UV-Licht aufgenommen. **A, B** *Reversed Northern Blot*-Analyse dieser PCR-Amplifikate nach Hybridisierung mit komplexen cDNA-Erststrangsonden von WP- (**A**) und DCINA- (**B**) behandelten Gerstenblättern. Die Ergebnisse aus der ersten (1.) bzw. zweiten (2.) *Reversed Northern*-Analyse sind als Vergleich der jeweiligen Signalstärken angegeben: ↑ stärkeres, ↓ schwächeres, - gleich starkes Signal nach Hybridisierung mit der DCINA-Sonde. 0 kein Signal detektierbar. Anstelle von Klon 4-03 wurde versehentlich Klon 4-04 im zweiten *Reversed Northern* überprüft.

Ein Vergleich der Signalintensität der unterschiedlich hybridisierten cDNA-Amplifikate konnte für alle Klone mit Ausnahme von 3-18 und 3-28 durch unterschiedlich lange Expositionszeiten der *Blots* mit dem Röntgenfilm vorgenommen werden. Bei einigen Klonen ließ sich das Ergebnis des ersten *Reversed Northern* bestätigen, bei anderen traten jedoch widersprüchliche Expressionsmuster auf. In zweifelhaften Fällen wurde der Klon in die weiteren Untersuchungen mit einbezogen. Damit belief sich die Zahl der cDNA-Klone potentiell differentiell exprimierter Gene auf 26 (Tab. 3.1). Nach Sequenzierung der 26 Kandidaten und Sequenzvergleichen untereinander und mit Nukleinsäure- oder Proteinsequenzen aus der *NCBI GenBank* stellte sich heraus, dass die Klone cDNA-Fragmente 21 verschiedener Gene enthielten (Konsensussequenzen s. Anhang, Tab. 8.1). Die Klone 1-93 und 3-83, enthielten cDNA-Fragmente desselben Gens, die Klone 2-13 und 5-74 (*Bci*-3), sowie die Klone 3-1, 3-41, 4-40 und 4-62 (*Bci*-4) enthielten jeweils ein gleiches Fragment (*Alignments* s. Anhang, Abb. 8.1 bis 8.3).

Tab. 3.1 Sequenzvergleich der cDNA-Klone potentiell differentiell exprimierter Gene.

Klon -Nr.	Größe (bp) ¹	Datenbankeintrag mit höchster Sequenzähnlichkeit ²	blastn/nr-Wert/ blastx/nr-Wert ³
1-62	392	<i>Hordeum vulgare</i> 14-3-3-like protein A (14-3-3A) ⁴ , Acc.Nr. X62338/P29305 (1361 bp/262 aa)	0.0; 384/393 (97%)/ 2e ⁻³¹ ; 63/84 (75%)
1-90	195	<i>Triticum aestivum</i> chloroplast phosphoglycerate kinase (EC 2.7.2.3) ⁵ , Acc.Nr. X15233/P12782 (1605 bp/480 aa)	5e ⁻⁷⁶ ; 181/192 (94%)/ 3e ⁻¹³ ; 35/36 (97%)
1-93	234	<i>Arabidopsis thaliana</i> putative RNA binding protein, Acc.Nr. Y15382 (374 aa), s. auch 3-83	-/ 4e ⁻⁰⁴ ; 20/25 (80%)
2-13	246	<i>Glycine max</i> root nodule-enhanced acid phosphatase (EC 3.1.3.-), Acc.Nr. T07086 (264 aa)	-/ 5e ⁻¹³ ; 43/84 (51%)
2-94	346	<i>Cicer arietinum</i> hypothetical protein, Acc.Nr. CAB71132 (216 aa)	-/ 3e ⁻¹⁰ ; 30/35 (85%)
3-01	312	gleiches Fragment wie 4-62, s.u.	
3-06	354	<i>Hordeum vulgare</i> type III chlorophyll a/b-binding polypeptide of the light-harvesting complex II ⁶ , Acc.Nr. X63197/P27523 (928 bp/268 aa)	1e ⁻¹⁷⁰ ; 311/313 (99%)/ 5e ⁻³² ; 66/67 (98%)
3-12	281	<i>Hordeum vulgare</i> seedling root EST, Acc.Nr. BF260884 (482 bp) mit Ähnlichkeit zu <i>A. th.</i> Apyrase ⁷ , Acc.Nr. AAF00071 (471 aa): 1e ⁻⁰⁶ ; 23/35 (65%)	1e ⁻¹³⁹ ; 268/275 (97%) (blastn/other ESTs)
3-16	387	<i>Medicago sativa</i> annexin-like protein ⁸ , Acc.Nr. CAA72183 (333 aa)	-/ 2e ⁻⁴³ ; 88/128 (68%)
3-33	518	<i>T. aestivum</i> S-adenosylmethionine decarboxylase prec. ⁹ , Acc.Nr. AF117660/AAD17232 (1386 bp/392 aa)	1e ⁻¹⁰¹ ; 286/323 (88%)/ 2e ⁻²⁸ ; 69/97 (71%)
		wild barley S-adenosylmethionine decarboxylase proenzyme (EC 4.1.1.50) ¹⁰ , Acc.Nr. Q42829 (393 aa)	6e ⁻²⁹ ; 70/97 (72%)
3-39	474	<i>Arabidopsis thaliana</i> peptidylprolyl isomerase-like protein, Acc.Nr. CAC05440 (259 aa) with strong similarity to <i>A. th.</i> chloroplast stromal cyclophilin (ROC4), Acc.Nr. L14845	-/ 2e ⁻³² ; 63/80 (78%)

Fortsetzung Tab. 3.1

3-41	308	gleiches Fragment wie 4-62, s.u.	
3-66	400	keine Homologien (256 bp sequenziert)	
3-70	295	<i>Avena sativa</i> fructose 1,6-bisphosphate aldolase precursor ¹¹ , nuclear gene for chloroplast product, Acc.Nr. AF216582/AAF74220 (1577 bp/388 aa)	1e ⁻³⁴ ; 96/101 (95%)/ 0.007; 18/20 (90%)
3-76	512	<i>T. aestivum</i> plastid omega-3 fatty acid desaturase ¹² , Acc.Nr. D43688/BAA07785 (1515 bp/380 aa)	1e ⁻¹⁶⁸ ; 416/491 (84%)/ 5e ⁻⁷⁷ ; 135/164 (82%)
3-77	484	<i>Spinacia oleracea</i> plastid-specific ribosomal protein 2 precursor ¹³ , Acc.Nr. AF240462 (260 aa)	-/ 1e ⁻¹⁵ ; 42/76 (55%)
3-83	804	<i>Arabidopsis thaliana</i> putative RNA binding protein, Acc.Nr. Y15382/CAA75602 (1291 bp/374 aa) und <i>A. th. g5bf</i> , Acc.Nr. Y10557 (378 aa)	9e ⁻⁰⁸ ; 77/92 (83%)/ 1e ⁻¹⁰⁵ ; 138/163 (84%)
3-91	288	<i>Oryza sativa</i> mRNA, partial homologous to chaperonin 10 gene, Acc.Nr. D29698 (319 bp)	1e ⁻¹⁶ ; 64/70 (91%)/ -
		<i>Lycopersicon esculentum</i> chaperonin 21 prec., Acc.Nr. AF233745 (253 aa)	0.001; 20/26 (76%)
4-03	632	<i>Oryza sativa</i> putative chloroplast inner envelope protein, Acc.Nr. AAG13554 (988 aa)	-/ 3e ⁻⁵⁴ ; 112/175 (64%)
4-12	306	<i>Zea mays</i> subtilisin-chymotrypsin inhibitor ^{14,15} , Acc.Nr. X69972/S61830 (457 bp/73 aa)	7e ⁻⁰⁴ ; 25/25 (100%)/ 4e ⁻¹⁹ ; 44/59 (74%)
4-40	308	gleiches Fragment wie 4-62, s.u.	
4-56	450	<i>H. vulgare</i> methyljasmonate-inducible lipoxygenase 2 (EC 1.13.11.12) ¹⁶ , Acc.Nr. U56406/T06190 (3054 bp/936 aa)	0.0; 396/397 (99%)/ 1e ⁻⁴⁰ ; 85/85 (100%)
4-62	307	<i>A. thaliana</i> unknown protein, Acc.Nr. AAG52340 (195 aa)	-/ 2e ⁻⁰⁹ ; 29/52 (55%)
		für Konsensus aller gleichen Fragmente	7e ⁻¹¹ ; 32/61 (52%)
4-76	281	<i>Hordeum vulgare</i> rubisco activase (RcaA1, RcaA2) ¹⁷ , Acc.Nr. M55446, M55447 (1394, 1709 bp)	1e ⁻¹⁴¹ ; 265/268 (98%)/
		<i>H. vulgare</i> rubisco activase (EC 6.3.4.-) A2, Acc.Nr. T06176 (464 aa)	5e ⁻³⁹ ; 69/70 (98%)
5-03	289	<i>Hordeum vulgare</i> BARE-1 copia-like retroelement, Acc.Nr. Z17327 (13271 bp) ¹⁸	7e ⁻¹⁴ ; 70/79 (88%); 3e ⁻³⁴ ; 181/222 (81%)
		<i>H. vulgare</i> seedling root EST, Acc.Nr. BF257699 (528 bp)	(blastn/other ESTs)
5-74	246	gleiches Fragment wie 2-13, s.o.	

¹Angabe der cDNA-Fragmentgröße in Anzahl Basenpaare (bp) ohne Primersequenz. ²Stand Januar 2001. ³Angabe des erwarteten Wertes *e* (*expected value*); Anzahl identischer Nukleotide (bp) bzw. Aminosäuren (aa) bezogen auf die verglichene Sequenz und gleiche Angabe in %. ⁴Brandt *et al.* 1992(a). ⁵Longstaff *et al.* 1989. ⁶Brandt *et al.* 1992(b). ⁷Steinebrunner *et al.* 2000. ⁸Kovacs *et al.* 1998. ⁹Li & Chen 2000. ¹⁰Dresselhaus *et al.* 1996. ¹¹Michelis & Gepstein 2000. ¹²Horiguchi *et al.* 1996. ¹³Yamaguchi *et al.* 2000. ¹⁴Cordero *et al.* 1994. ¹⁵Chevalier *et al.* 1995. ¹⁶Vörös *et al.* 1998. ¹⁷Rundle & Zielinski 1991. ¹⁸Manninen & Schulman 1993.

Weitere Arbeiten mit den Klonen 2-94 und 3-77 von Uli Beckhove, IPAZ Gießen, führten zur Verlängerung der jeweiligen Sequenz, wodurch sich die angegebenen Werte für die Ähnlichkeit zu den oben genannten Sequenzen erhöhten. Ebenso erwies sich die verlängerte Sequenz von Klon 3-12 als homolog zu Apyrasen im Vergleich der Aminosäuresequenz (blastx).

3.3 UNTERSUCHUNG DER GENEXPRESSION AUF TRANSKRIPTIONSEBENE

Von allen cDNA-Klonen, die aus den *Reversed Northern*-Analysen (s. 3.2) als Kandidaten für differentielle, chemisch induzierte Gene hervorgingen, wurden DNA- bzw. RNA-Sonden hergestellt. Ausgenommen davon blieben Klon 4-56, bei dem es sich um cDNA eines bereits bekannten DCINA-induzierbaren Gens (*Lox2:Hv:1*, Vörös *et al.* 1998) handelte, und dessen vollständige Sequenz bereits am IPAZ verfügbar war, sowie die Klone 3-01, 4-40 und 5-74, deren cDNA-Fragmente in mehreren Klonen vertreten waren (s. Tab. 3.1; s. Anhang, Abb. 8.3 und 8.2a).

3.3.1 Genexpression nach Chemischer Induktion

3.3.1.1 Genexpression nach Applikation der Resistenzinduktoren DCINA und BTH

Zunächst wurden *Northern Blot*-Analysen mit den RNA-Proben aus der Kinetik chemisch mit DCINA-induzierter Gerstenprimärblätter der Mutante A89, die in den Ansatz der subtraktiven Suppressionshybridisierung einging, durchgeführt. Es stand RNA von zwei unabhängigen Ansätzen zur Verfügung (s. Anhang, Abb. 8.4 A, B). Aus diesen und weiteren unabhängigen Versuchen gingen neun Gene hervor, deren differentielle Expression nach Applikation chemischer Induktoren bestätigt werden konnte. Diese Gene wurden daher als *Bci*-Gene (*Bci* für *barley chemically induced*) bezeichnet (Beßer *et al.* 2000). Zusätzlich zu den Genen, die durch die Klone 2-13, 2-94, 3-12, 3-76, 3-77, 4-12, 4-56 und 4-62 repräsentiert werden (s. Tab. 3.2), wurde ein Thionin (Homologie zu Accession Nr. M19048, Gausing 1987) in die Gruppe der *Bci*-Gene mit einbezogen. Das Thionin wurde von Birgit Jarosch, IPAZ Gießen, identifiziert, ebenso wie ein weiteres cDNA-Fragment des Gens repräsentiert durch Klon 2-13. Im folgenden wurde für die Detektion dieses Gens in Expressionsstudien eine Sonde verwendet, die von der durch *RACE* verlängerten Sequenz abgeleitet worden war (Jarosch, Dissertation in Vorbereitung). In Abbildung 3.5 sind die *Northern Blots* der 9 *Bci*-Gene nach chemischer Induktion mit DCINA im Vergleich zur Expression des *pathogenesis-related protein Pr-1b* gezeigt.

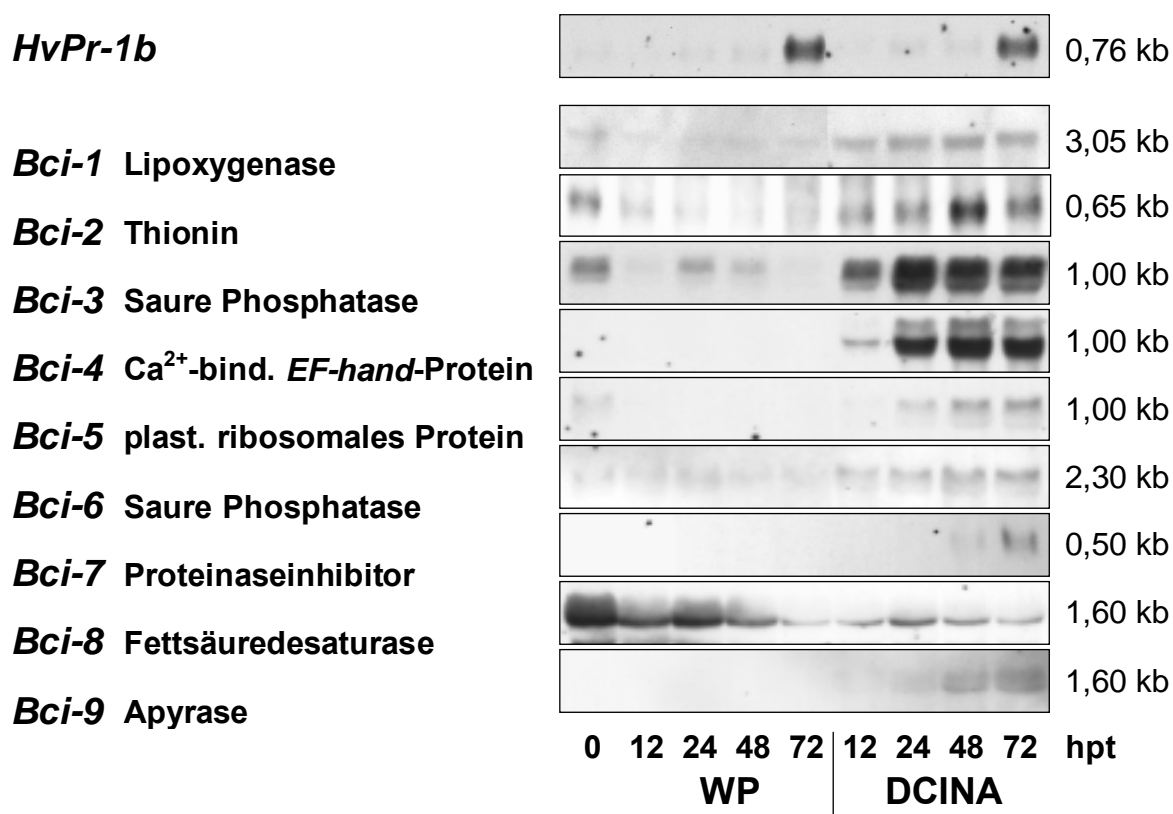


Abb. 3.5 Transkriptakkumulation der *Bci*-Gene nach DCINA-Applikation.

Fünf Tage alte Gerstenkeimlinge der Mutante A89 wurden mit 5 mg L⁻¹ DCINA bezogen auf das Bodenvolumen oder mit der Leerformulierung WP gegossen. Primärblätter wurden zu angegebenen Zeitpunkten (hpt) geerntet und Gesamt-RNA extrahiert. Nach gelelektrophoretischer Trennung (10 µg RNA pro Spur) wurde die Expression der *Bci*-Gene und *HvPr-1b* in *Northern Blot*-Analysen untersucht. Rechts ist die jeweilige abgeschätzte Transkriptgröße in Kilobasenpaaren (kb) angegeben. Die gleichmäßige RNA-Beladung des Gels wurde anhand EtBr-vermittelter Fluoreszenz der ribosomalen RNA unter UV-Licht überprüft (s. Anhang, Abb. 8.4). Die *Blots* mit *HvPr-1b*, *Bci-1* bis *Bci-3* wurden von Birgit Jarosch durchgeführt.

Bci-8 wurde als einziges Gen dieser Gruppe durch Applikation chemischer Induktoren herunter reguliert. Die Genexpression von *Bci-5* wurde in ersten Experimenten nach DCINA- und BTH-Behandlung als induziert gewertet, was sich in weiteren Experimenten jedoch nicht bestätigen ließ (s. Anhang, Abb. 8.5), bzw. umkehrte (Abb. 3.7). Tabelle 3.2 fasst diese Ergebnisse zusammen.

Tab. 3.2 Nach chemischer Resistenzinduktion in Gerste differentiell exprimierte Gene.

BCI	Klon-Nr.	Homologie	Expression nach DCINA/BTH	Accession Nr.
1	4-56	Lipoxygenase (<i>Lox2:Hv:1</i>)	↑	U56406
2		Thionin	↑	
3	2-13	Saure Phosphatase	↑	AJ250282
4	4-62	Ca ²⁺ -bindendes <i>EF-hand</i> -Protein	↑	AJ250283
5	3-77	plastidäres ribosomales Protein	↑? ↓?	AJ250661
6	2-94	Saure Phosphatase	↑	AJ250662
7	4-12	Proteinaseinhibitor	↑	AJ250663
8	3-76	Fettsäuredesaturase	↓	AJ250664
9	3-12	Apyrase	↑	AJ250665
-	1-62	14-3-3-Protein (<i>Hv14-3-3</i>)	↓ ?	
-	3-16	Annexin	↓ ?	

Differentielle Transkriptakkumulation nach chemischer Induktion konnte für die Klone 1-62 und 3-16 (s. Tab. 3.2) nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden (s. Anhang, Abb. 8.6). Da es sich jedoch um cDNA-Fragmente interessanter Gene handelt, wurden sie in einige Untersuchungen mit einbezogen.

Mit der Sonde von Klon 3-66 konnte in keinem Fall ein Signal detektiert werden, die Sonden der Klone 3-41 und 3-83 detektierten das gleiche Expressionsmuster wie Klon 4-62 (*BCI-4*) bzw. 1-93, die jeweils cDNA desselben Gens enthielten (s. Tab. 3.1; s. Anhang, Abb. 8.3 und 8.1). Die Klone 1-90, 3-39, 3-91, 4-03 und 5-03 erwiesen sich als Fragmente nicht differentiell exprimierter Gene nach DCINA-Induktion (s. Anhang, Abb. 8.4). Einige Kandidaten-Gene, repräsentiert von Klon 1-93, 3-06, 3-33, 3-70 und 4-76, schieden nach unabhängigen *Northern Blot* Experimenten chemisch induzierter (DCINA, BTH) Gerstenblätter als (wahrscheinlich) nicht differentiell exprimiert aus (ohne Abbildung).

3.3.1.2 Gewebespezifische *Bci*-Genexpression in Gerstenblättern

Der Echte Mehltaupilz wächst auf der Blattoberfläche (Mycel- und Konidienbildung) und dringt nur in Epidermiszellen ein, in denen ein Haustorium etabliert wird. So erfolgen im cIR-Phänotyp die ersten mikroskopisch sichtbaren Abwehrreaktionen in der Epidermis (Papillenbildung und HR, s. 3.1.1). Daher sollte die Expression der *Bci*-Gene im Vergleich zu dem PR(*pathogenesis-related*)-Gen *Pr-1b* getrennt in der Epidermis und im Mesophyll nach chemischer Induktion mit BTH untersucht werden (s. 2.3.2; Sondenherstellung s. 2.6.5). Nur *Bci-7* erwies sich als sowohl im Mesophyll als auch in der Epidermis exprimiert. Alle anderen *Bci*-Gene waren ausschließlich im Mesophyll induziert. Die Genexpression von *Bci-5* wurde neben der von *Bci-8* in diesem Experiment nach BTH-

Applikation herunter reguliert, die Expression aller anderen *Bci*-Gene war frühestens nach 12 hpt hoch reguliert.

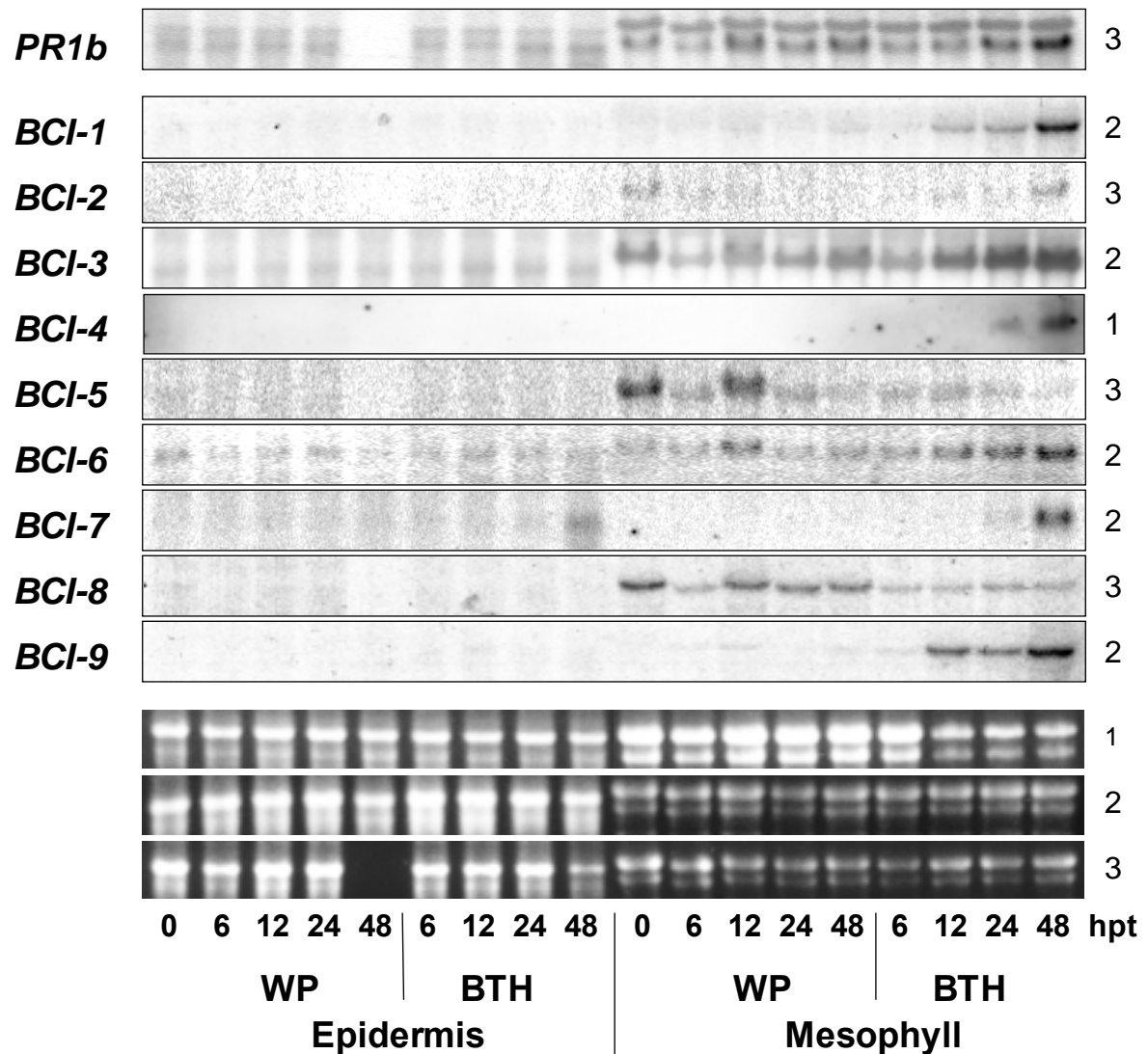


Abb. 3.6 Transkriptakkumulation der *Bci*-Gene und von *HvPR-1b* in Epidermis und Mesophyll nach BTH-Applikation.

Sechs Tage alte Gerstenkeimlinge cv. Ingrid wurden mit 20 mg L⁻¹ BTH bezogen auf das Bodenvolumen oder mit der Leerformulierung WP gegossen. Primärblätter der Gerstenpflanzen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten (hpt) geerntet, die abaxiale Epidermis vom restlichen Blatt (Mesophyll) getrennt. Nach gelelektrophoretischer Trennung (6,8 µg RNA pro Spur) und Herstellung von *Northern Blots* wurde die mRNA mit Fluorescein- (*Bci-4*) oder radioaktiv markierten (alle übrigen) Sonden von *Bci-1* bis *Bci-9* und *HvPR-1b* unter stringenten Bedingungen hybridisiert. Die gleichmäßige RNA-Beladung des Gels wurde anhand EtBr-vermittelter Fluoreszenz der ribosomalen RNA unter UV-Licht überprüft. Ziffern rechts neben den Filmen und Gelen geben jeweils den zugehörigen *Blot* an.

3.3.1.3 *Bci*-Genexpression nach Salicylsäure(SA)-Applikation

In zwei unabhängigen Versuchen wurde die Aktivierung der *Bci*-Gene durch den natürlichen Resistenzinduktor SA untersucht. Im ersten Versuch wurden Primärblattproben nach 6 hpt, und weiter im Tagesrhythmus (1-5 und 7 dpt) entnommen und in *Northern Blot*-Analysen untersucht. Dabei zeigte sich, dass eine Transkriptakkumulation nur zu einem Zeitpunkt (24 hpt, Abb. 3.7) nachweisbar war. Daher wurden die Blattproben im zweiten Versuch in kürzeren Intervallen (6 h-Rhythmus) geerntet (Abb. 8.7). Die erste Untersuchung belegte die Geninduktion von *Bci-1*, *Bci-3*, *Bci-4*, und *Bci-7* 24 h nach SA-Applikation, und in Übereinstimmung mit den Ergebnissen nach DCINA und BTH eine verringerte Expression von *Bci-8* (Abb. 3.7).

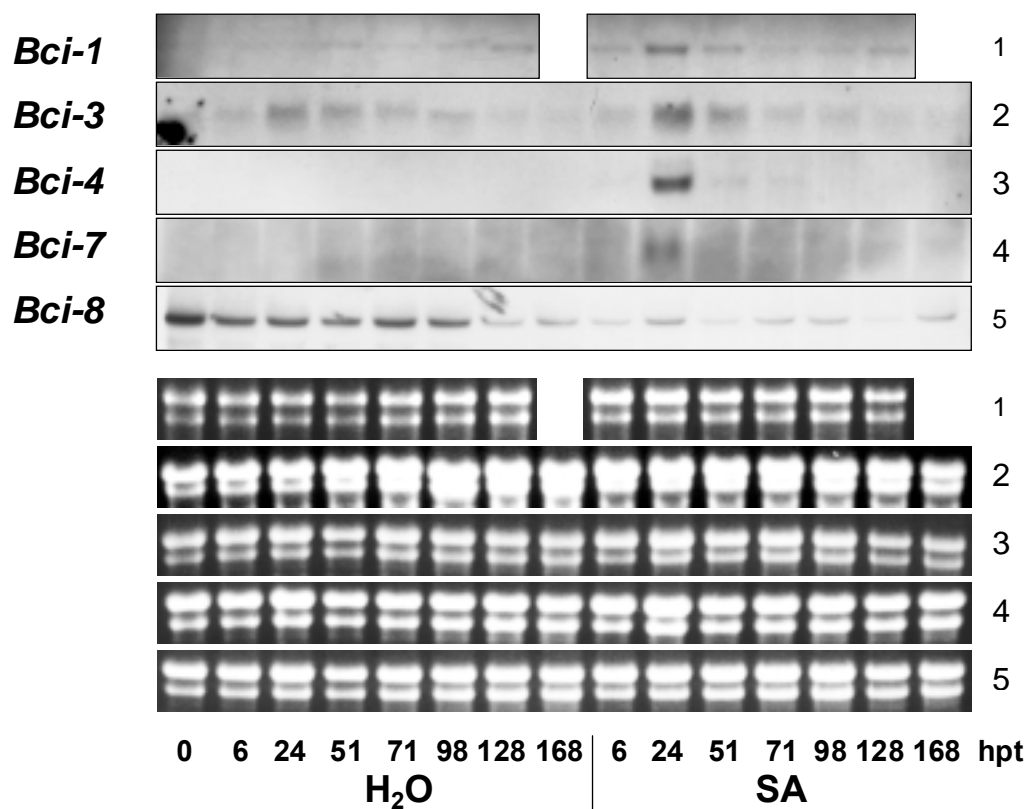


Abb. 3.7 Transkriptakkumulation der *Bci*-Gene nach SA-Applikation.

Sieben Tage alte Gerstenkeimlinge cv. Ingrid wurden mit 100 mg L⁻¹ SA bezogen auf das Bodenvolumen oder mit Wasser (H₂O) gegossen. Primärblätter der Gerstenpflanzen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten (hpt) geerntet und Gesamt-RNA extrahiert. Nach gelelektrophoretischer Trennung (9-10 µg RNA pro Spur) und Herstellung von *Northern Blots* wurde die mRNA mit Sonden von *Bci-1* bis *Bci-9* unter stringenten Bedingungen hybridisiert. Die gleichmäßige RNA-Beladung des Gels wurde anhand EtBr-vermittelter Fluoreszenz der ribosomalen RNA unter UV-Licht überprüft. Ziffern rechts neben den Filmen und Gelen geben jeweils den zugehörigen *Blot* an. Es sind nur die Ergebnisse der *Bci*-Gene dargestellt, die nach SA-Applikation differentiell exprimiert waren.

Bci-2 wurde nicht getestet und für *Bci-5*, *Bci-6*, und *Bci-9* konnte keine Genexpression nachgewiesen werden (nicht abgebildet). Im zweiten Experiment konnte die Induktion von *Bci-4* (12-36 hpt) bestätigt, eine schwache Induktion von *Bci-3* (24 und 31 hpt) und noch schwächere von *Bci-6* (24 hpt) und *Bci-8* (49 hpt) detektiert werden (s. Anhang, Abb. 8.7). *Bci-1* wurde in diesem Versuch nicht getestet, *Bci-2* war nicht induziert, ebenso wie *Bci-5* und *Bci-9* entsprechend dem ersten Experiment (nicht abgebildet). *Bci-7* war entgegen dem ersten Versuch nicht differentiell exprimiert (nicht abgebildet).

Zusammenfassend (s. auch Tab. 3.3) lässt sich feststellen, dass eine Genaktivierung nach SA-Behandlung nicht bei allen BCI-Genen nachweisbar war (nicht bei: *Bci-2*, *Bci-5*, *Bci-9*) und zudem zwischen beiden Experimenten differierte. Im Falle einer Detektion war die Transkriptakkumulation schwächer und von kürzerer Dauer (um 24-36 h) als nach DCINA- und BTH-Applikation (Abb. 3.5 und 3.6).

3.3.2 *Bci*-Genexpression nach Phytohormonapplikation

Die Signaltransduktionswege der Induzierten Resistenz können sich mit anderen Signalketten überschneiden, bzw. mit ihnen interagieren (s. Einleitung). Einen Hinweis darauf kann eine Kreuzaktivierung der Elemente solcher Signalwege durch verschiedene Reize geben. Aus diesem Grund wurde die Induzierbarkeit der *Bci*-Gene und einiger zusätzlich im SSH-Ansatz identifizierter Gene durch Applikation verschiedener Phytohormone jeweils im Vergleich mit *HvPR-1b* untersucht.

3.3.2.1 *Bci*-Genexpression nach Jasmonsäuremethylester(JM)-Applikation

Primärblattsegmente der Gerstenlinien cv. Ingrid, *backcross* (BC)Ingrid-*mlo5* und der Mutante A89 wurden auf einer wässrigen Lösung von 45 µM JM oder zur Kontrolle auf Wasser 'gefloated'. Nach ein und zwei Tagen wurden Blattproben entnommen und *Northern Blot*-Analysen durchgeführt. Als positiv-Kontrolle für eine wirksame Behandlung mit JM wurde die Genexpression des jasmonatresponsiven Proteins JIP-23 (*jasmonat induced protein 23*, Ortel *et al.* 1999; Hause *et al.* 1999a) überprüft. Die Sonde wurde von Claus Wasternack, Leibniz Institut für Pflanzenbiochemie, Halle, zur Verfügung gestellt. Eine nach Einwirkung von JM differentielle Genexpression konnte neben der von *Jip-23* für *HvPr-1b*, *Bci-1*, *Bci-2*, *Bci-3*, *Bci-6*, *Bci-7*, *Bci-8* und *Bci-9* in allen Genotypen nachgewiesen werden (Abb. 3.8). *Bci-4* war nur in cv. Ingrid schwach und *Bci-5* und Klon 1-62 nicht induziert. Klon 3-16 wurde reprimiert.

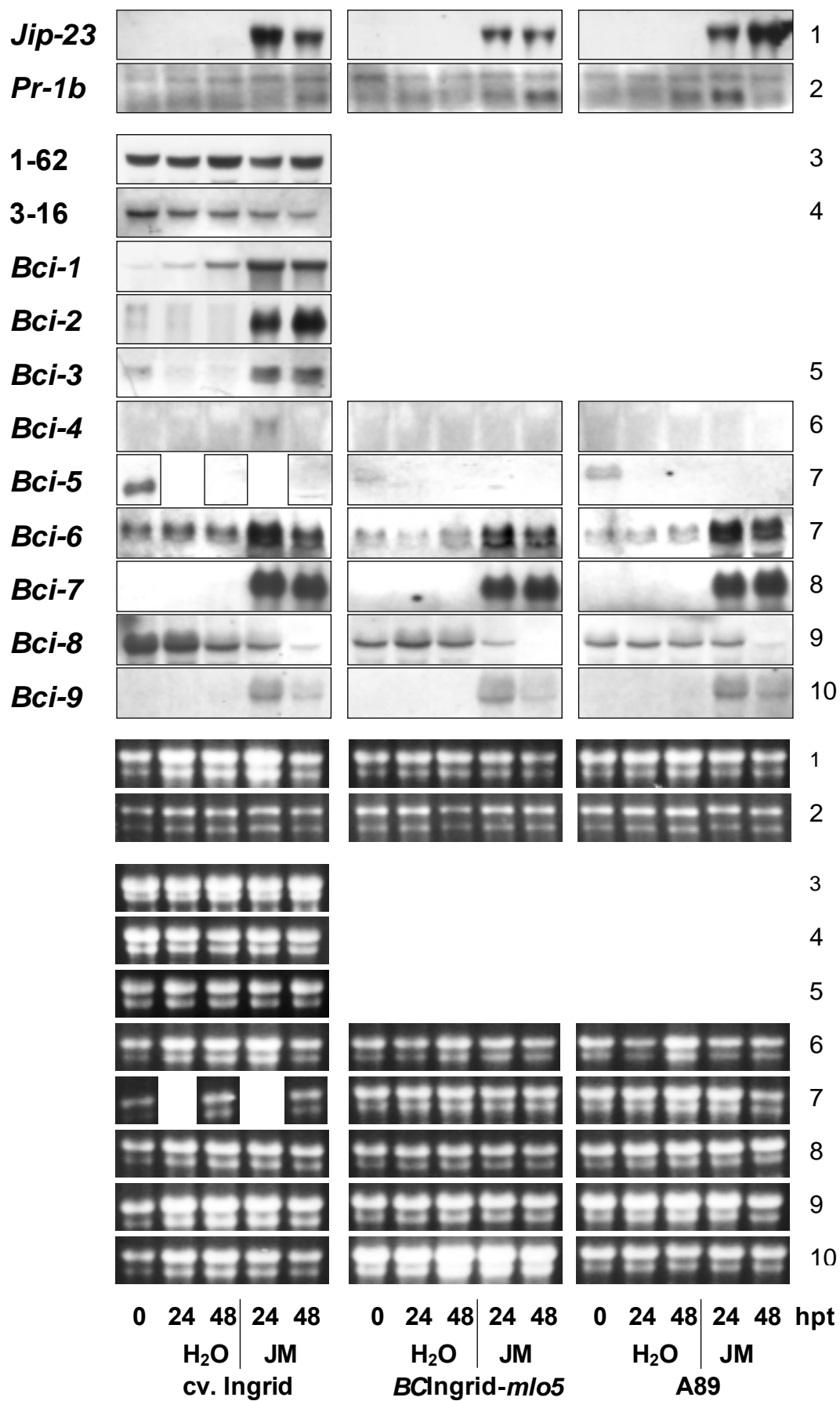


Abb. 3.8 Transkriptakkumulation der *Bci*-Gene im Vergleich zu *HvPr-1b* und *Jip-23* nach JM-Applikation. Legende s. nächste Seite.

Abb. 3.8 Transkriptakkumulation der *Bci*-Gene im Vergleich zu *HvPr-1b* und *Jip-23* nach JM-Applikation.

Primärblattsegment sieben Tage alter Gerstenkeimlinge cv. Ingrid, *BCIngrid-mlo5* und A89 wurden auf 45 µM Jasmonsäuremethylester (JM) oder Wasser (H₂O) 'gefloatet'. Blattproben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten (hpt) entnommen und Gesamt-RNA extrahiert. Nach gelelektrophoretischer Trennung (Gel 2: 2 µg RNA, alle anderen: 9-10 µg RNA pro Spur) und Herstellung von *Northern Blots* wurde die mRNA mit Sonden von *Bci-1* bis *Bci-9*, Klon 1-62 (*Hv14-3-3*) und 3-16 (Annexin-Homolog), *HvPr-1b* und *Jip-23* unter stringenten Bedingungen hybridisiert. Die gleichmäßige RNA-Beladung des Gels wurde anhand EtBr-vermittelter Fluoreszenz der ribosomalen RNA unter UV-Licht überprüft. Ziffern rechts neben den Filmen und Gelen geben jeweils den zugehörigen *Blot* an. Die *Northern*-Analysen mit *Bci-1* und *Bci-2* wurden von Birgit Jarosch durchgeführt.

3.3.2.2 *Bci*-Genexpression nach Sorbitapplikation

Das 'Floaten' von Primärblattsegmenten auf wässriger 1 M Sorbitlösung führt über osmotischen Stress zur Erhöhung des endogenen Jasmonatspiegels (Lehmann *et al.* 1995). In einem Experiment wurde die Wirkung einer 1 M Sorbitlösung auf die Induktion der *Bci*-Gene anhand von *Northern Blot*-Analysen untersucht und das Ergebnis mit dem exogener JM-Applikation verglichen. Primärblattsegmente von Gerstenkeimlingen cv. Ingrid, *BCIngrid-mlo5*, cv. Pallas und *BCPallas-mlo5* wurden auf 1 M Sorbit (S) oder Wasser (K) 'gefloatet'. Die Induktion jasmonatresponsiver Gene und damit indirekt auch ein Anstieg des endogenen Jasmonatgehaltes konnte anhand der Akkumulation von *Jip-23* in allen Genotypen nachgewiesen werden (Abb. 3.9). Die Induktion war jedoch schwächer als die durch exogenes Jasmonat verursachte (Abb. 3.8). Die Genexpression von *Bci-7* war reproduzierbar und unabhängig von der Gerstenlinie deutlich in vergleichbarem Maße wie durch JM induziert (Abb. 3.9 und 3.8). *HvPr-1b* akkumulierte dagegen nach zweistündiger Einwirkung von Sorbit nicht in cv. Ingrid, wohl aber in den anderen Genotypen (Abb. 3.9). Nach 'Floaten' von Blättern auf JM war *HvPr-1b*-Transkript zwar in allen getesteten Genotypen nachweisbar, in cv. Ingrid jedoch später als in den anderen Linien (Abb. 3.8). *Bci-8* wurde ebenso wie nach chemischer Induktion (DCINA und BTH, Abb. 3.5 und 3.6) und JM-Applikation (Abb. 3.8) reprimiert (Abb. 3.9). Entgegen den Ergebnissen nach Behandlung mit Resistenzinduktoren (Abb. 3.5 und 3.6) und JM (Abb. 3.8) führte Sorbit zu einer reduzierten Genexpression von *Bci-3* (Abb. 3.9). Dies wurde in einem unabhängigen Experiment für alle getesteten Genotypen reproduziert. Eine Induktion der Gene *Bci-2*, *Bci-4*, *Bci-5*, *Bci-6* und *Bci-9* durch die Sorbitapplikation konnte nicht nachgewiesen werden, die von *Bci-1* wurde nicht überprüft, da bereits bekannt war, dass *Lox2:Hv:1*-Transkript nicht nach 1 M Sorbit akkumuliert (Vörös *et al.* 1998).

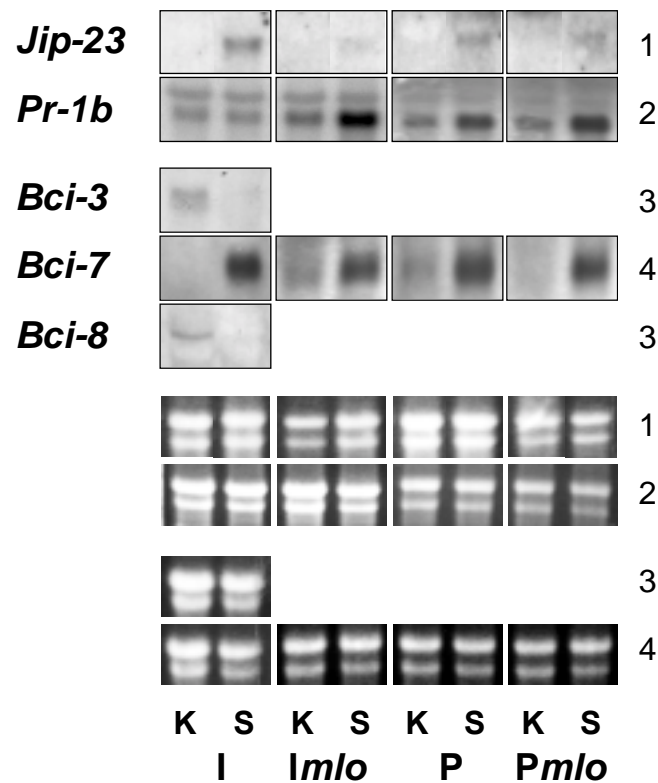


Abb. 3.9 Transkriptakkumulation der *Bci*-Gene im Vergleich zu *HvPr-1b* und *Jip-23* nach Sorbitapplikation.

Primärblattsegmente sieben Tage alter Gerstenkeimlinge cv. Ingrid (I), *BCIngrid-mlo5* (*Imlo*), cv. Pallas (P) und *BCPallas-mlo5* (*Pmlo*) wurden auf 1 M Sorbit (S) oder Wasser (K) 'gefloatet'. Blattproben wurden nach 2 h (*Pr-1b*, *Bci-7*), 24 h (*Jip-23*) oder 48 h (*Bci-3*, *Bci-8*) entnommen und Gesamt-RNA extrahiert. Nach gelelektrophoretischer Trennung (Gel 2 P und *Pmlo*: 3,25 µg RNA, alle übrigen: 10 µg RNA pro Spur) wurden *Northern Blots* mit Transkript- oder DNA-Sonden von *Bci-2* bis *Bci-9*, *HvPr-1b* und *Jip-23* unter stringenten Bedingungen hybridisiert. Die gleichmäßige RNA-Beladung des Gels wurde anhand EtBr-vermittelter Fluoreszenz der ribosomalen RNA unter UV-Licht überprüft. Ziffern rechts neben den Filmen und Geln geben jeweils den zugehörigen *Blot* an. Es sind nur die Ergebnisse der *Bci*-Gene dargestellt, die nach Sorbitbehandlung differentiell exprimiert waren.

3.3.2.3 *Bci*-Genexpression nach Ethylenbegasung

Der Einfluss von Ethylen auf die Expression der *Bci*-Gene wurde in zwei unabhängigen Versuchen durch Begasung von Primärblättern untersucht. Die Inkubation der Blattsegmente erfolgte mit verschiedenen Konzentrationen (10^{-3} , 1, 10 und 100 µL L⁻¹) Ethylengas oder in Luft (Kontrolle) für 4 bis 48 h. Die Genexpression von *HvPr-1b* war bereits bei der niedrigsten Ethylenkonzentration im Vergleich zur Kontrolle erhöht, nahm jedoch bei der höchsten Konzentration von 100 µL L⁻¹ wieder ab (Abb. 3.10). Transkript

von *Bci-1* und *Bci-7* akkumulierte dagegen erst nach vierstündiger Begasung mit $100 \mu\text{L L}^{-1}$ Ethylen. Im ersten Experiment erschien die Expression von *Bci-2* leicht reprimiert (Abb. 3.10), was sich im zweiten Versuch nicht bestätigen ließ (nicht abgebildet). Für *Bci-3*, *Bci-4*, *Bci-5*, *Bci-6*, *Bci-8* und *Bci-9* konnte keine Genaktivierung durch Ethylenbegasung nachgewiesen werden.

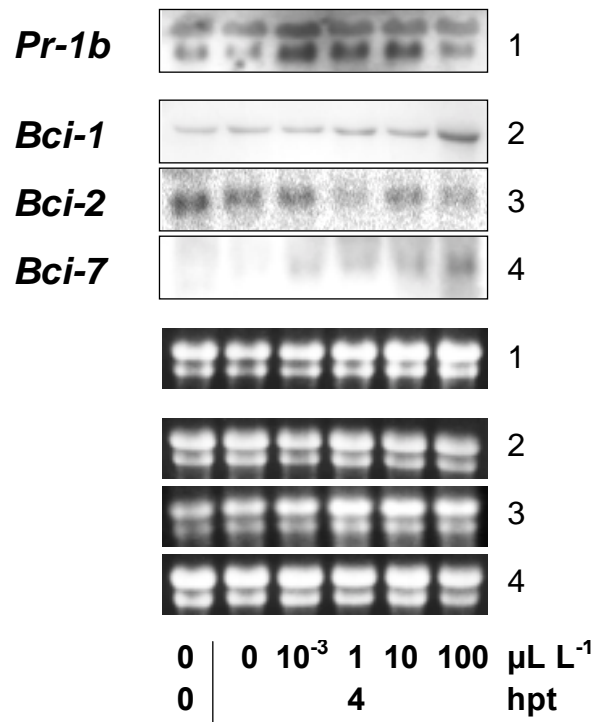


Abb. 3.10 Transkriptakkumulation der *Bci*-Gene im Vergleich zu *HvPr-1b* nach Ethylenbegasung.

Primärblattsegmente sieben Tage alter Gerstenkeimlinge cv. Ingrid wurden mit 10^{-3} , 1, 10 und $100 \mu\text{L L}^{-1}$ Ethylengas, Kontrollblätter mit Luft ($0 \mu\text{L L}^{-1}$) für 4 h (A) inkubiert. Nach Extraktion von Gesamt-RNA, gelelektrophoretischer Trennung (9-10 μg RNA pro Spur) und Herstellung von *Northern Blots* wurde die mRNA mit Transkriptsonden von *Bci-1* bis *Bci-9* (*Bci-2* radioaktiv markierte DNA-Sonde) und *HvPr-1b* unter stringenten Bedingungen hybridisiert. Die gleichmäßige RNA-Beladung des Gels wurde anhand EtBr-vermittelter Fluoreszenz der ribosomalen RNA unter UV-Licht überprüft. Ziffern rechts neben den Filmen und Gelen geben jeweils den zugehörigen *Blot* an. Es sind nur die Ergebnisse der *Bci*-Gene dargestellt, die nach Ethylenbegasung differenziell exprimiert waren.

3.3.2.4 *Bci*-Genexpression nach Abscisinsäure(ABA)-Applikation

Voll entwickelte Primärblätter von Gerstenkeimlingen cv. Ingrid wurden mit $50 \mu\text{M}$ ABA-Lösung, Kontrollpflanzen mit Wasser besprüht (vergl. 3.1.2.3, gleicher Ansatz). Nach 2 und 6 hpt bzw. 1, 2 und 5 dpt wurden Blattproben entnommen und auf Genaktivierung der

Bci-Gene und *HvPr-1b* untersucht. In keinem Fall konnte eine differentielle Genaktivität detektiert werden (ohne Abbildung).

3.3.3 *Bci*-Genexpression durch Verwundung

Voll entwickelte Primärblätter von Gerstenkeimlingen cv. Ingrid wurden mit Nadeln perforiert (vergl. 3.1.2.4, gleicher Ansatz), anschließend für *Northern*-Analysen geerntet und mit Sonden von *Bci-1* bis *Bci-9* und *HvPr-1b* beprobt. Die Genexpression von *Bci-3* und *BCI-6* war über den gesamten Zeitraum im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle durch die Verwundung induziert (Abb. 3.11). Für *Bci-7* war eine transiente Transkriptakkumulation zwischen 6 und 51 hpt nachweisbar. Die Expression von *Bci-8* war durch die Verletzung nur geringfügig reprimiert. Alle anderen *Bci*-Gene und *HvPr-1b* reagierten nicht differentiell auf den Verwundungsreiz.

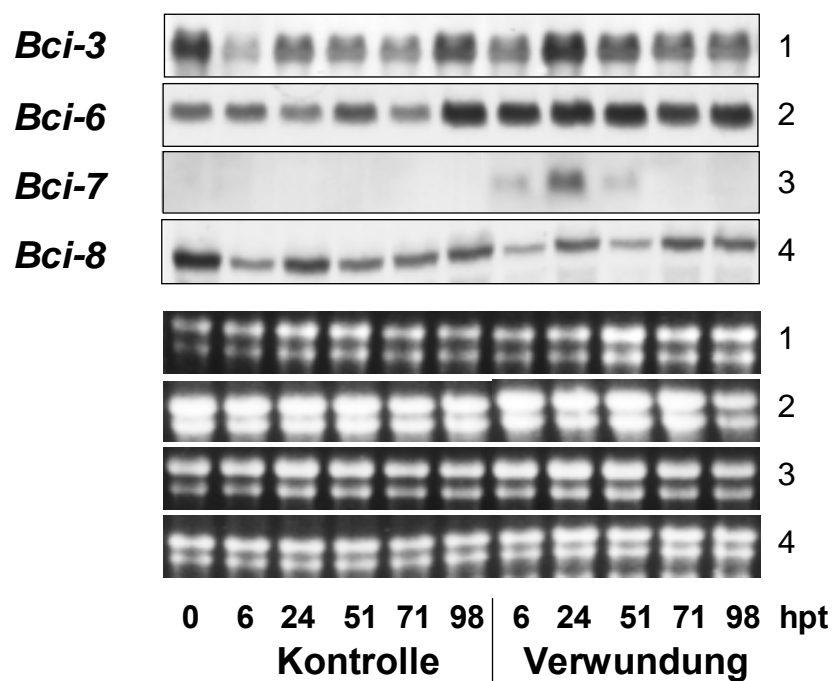


Abb. 3.11 Transkriptakkumulation der *Bci*-Gene nach Verwundung der Primärblätter.

Primärblätter sieben Tage alter Gerstenkeimlinge cv. Ingrid wurden mit Nadeln perforiert, Kontrollblätter blieben unverletzt. Nach Extraktion von Gesamt-RNA, gelelektrophoretischer Trennung (Gele 1 und 4: 7,2 µg RNA, Gel 2: 18 µg, Gel 3: 9 µg RNA pro Spur) und Herstellung von *Northern Blots* wurde die mRNA Transkript- oder DNA-Sonden von *Bci-1* bis *Bci-9* und *HvPr-1b* unter stringenten Bedingungen hybridisiert. Die gleichmäßige RNA-Beladung des Gels wurde anhand EtBr-vermittelter Fluoreszenz der ribosomalen RNA unter UV-Licht überprüft. Ziffern rechts neben den Filmen und Gelen geben jeweils den zugehörigen *Blot* an. Es sind nur die Ergebnisse der *Bci*-Gene dargestellt, die nach Verwundung differentiell exprimiert waren.

3.3.4 *Bci*-Genexpression nach Befall mit Pathogenen oder Schädlingen

In dikotylen Wirt-Pathogen-Interaktionen werden typische Markergene der SA-abhängigen systemisch Induzierten Resistenz (SAR) in der Pflanze exprimiert, unabhängig davon, ob die Resistenz durch den vorausgegangenen Kontakt mit einem Pathogen oder durch Applikation chemischer Induktoren hervorgerufen wurde. Des weiteren werden diese Gene auch bei resistenzgenvermittelter Abwehr von Pathogenen aktiviert. Aus diesem Grund sollte die Induzierbarkeit der nach chemischer Resistenzinduktion differentiell exprimierten *Bci*-Gene durch verschiedene Pathogene auf Transkriptebene untersucht werden. Es wurden Experimente mit dem biotrophen Echten Gerstenmehltaupilz der Rasse A6 (*BghA6*) in der kompatiblen und in inkompatiblen Interaktionen durchgeführt. Weiterhin wurden zwei nekrotrophe Pathogene, *Cochliobolus sativus* und *Rhynchosporium secalis*, in kompatiblen Interaktionen untersucht. Zusätzlich wurde eine mögliche Genaktivierung durch die Nicht-Wirt-Pathogene Echter Weizenmehltaupilz (*Bgt*) und verschiedenen Bakterien sowie durch den Befall mit der Großen Getreideblattlaus (*Sitobion avenae*) überprüft.

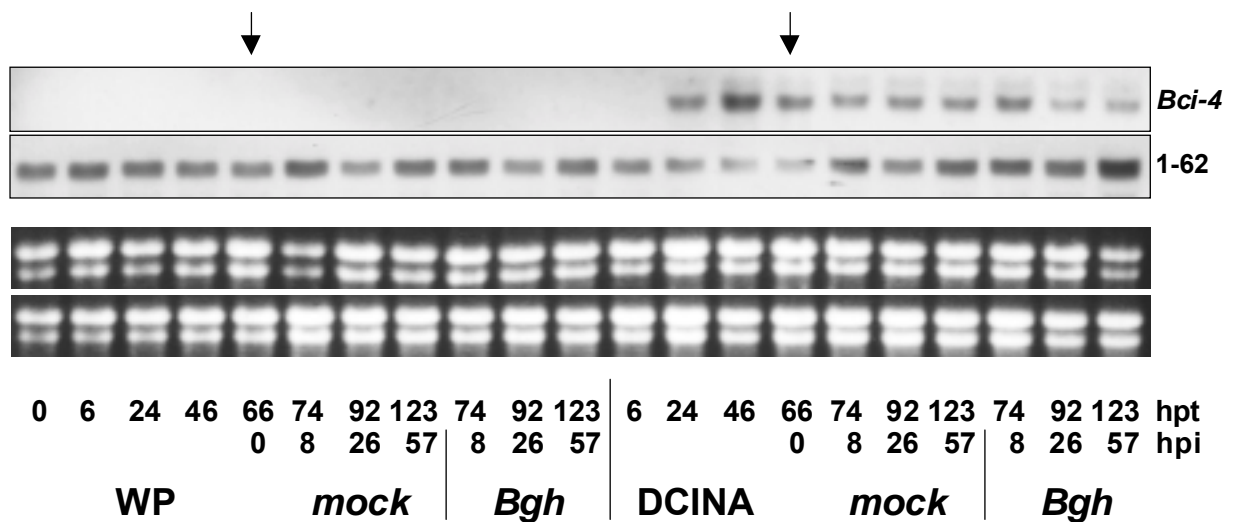
3.3.4.1 *Bci*-Genexpression durch *Blumeria graminis* f.sp. *hordei*

3.3.4.1.1 *Bci*-Genexpression durch *Blumeria graminis* f.sp. *hordei*

Sieben Tage alte Gerstenpflanzen (cv. Ingrid, suszeptibel sowie resistenter nahezu isogener Rückkreuzungslinien *BCIngrid-Mla12*, *BCIngrid-Mlg* und *BCIngrid-mlo5*) wurden mit *BghA6* inokuliert. Nach 6 und 12 hpi (*hours post inoculation*) und 1-4 und 6 dpi (*days post inoculation*) wurden die inokulierten Primärblätter geerntet, Gesamt-RNA extrahiert und *Northern Blot*-Analysen mit Sonden von *Bci-2* bis *Bci-9* durchgeführt. In keiner der Interaktionen konnte die Akkumulation von *Bci*-Gen Transkript nachgewiesen werden. Die Expression der Gene *Bci-3* (nur cv. Ingrid und *BCIngrid-mlo5* getestet), *Bci-6*, *Bci-7* und *Bci-8* war durch den Pilz teilweise deutlich reprimiert (s. Anhang, Abb. 8.8).

3.3.4.1.2 *Bci*-Genexpression nach *Bgh*-Inokulation von chemisch induzierter Gerste

Das Auftreten eines synergistischen Effektes in Bezug auf eine *Bci*-Genexpression bei Applikation chemischer Resistenzinduktoren und nachfolgender Inokulation mit einem Pathogen wurde in einem Experiment untersucht. Dafür wurden Gerstenpflanzen cv. Ingrid mit 10 mg L⁻¹ DCINA, bzw. mit der Leerformulierung WP gegossen und drei Tage später mit *BghA6* inokuliert (0,5 Konidien mm⁻²). Primärblätter wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach den Behandlungen geerntet und Genexpressionsanalysen für *Bci-3* bis *Bci-9* und für die Klone 1-62 und 3-16 unterzogen. Zusätzlich wurde die Resistenzinduktion durch DCINA mittels Auszählen der Mehltau Pusteln 7 dpi auf je 10 behandelten und Kontrollblättern überprüft. Der Befall war auf induzierten Blättern um ca.



Sieben Tage alte Gerstenkeimlinge cv. Ingrid wurden mit 10 mg L⁻¹ DCINA, bzw. mit der Leerformulierung WP gegossen und drei Tage später mit *BghA6* oder *mock*-inokuliert (Zeitpunkt der Inokulation ↓). Nach Extraktion von Gesamt-RNA aus Primärblättern, gelelektrophoretischer Trennung (1-62: 7,2 µg, *Bci-4*: 10 µg RNA pro Spur) und Herstellung von *Northern Blots* wurde die mRNA mit Transkriptsonden von *Bci-3* bis *Bci-9* und den Klonen 1-62 und 3-16 unter stringenten Bedingungen hybridisiert. Die gleichmäßige RNA-Beladung des Gels wurde anhand EtBr⁻-vermittelter Fluoreszenz der ribosomalen RNA unter UV-Licht überprüft. Es sind nur die Ergebnisse der *Bci*-Gene dargestellt, die nach Inokulation induzierter Blätter differentiell exprimiert waren.

Es wurden insgesamt drei unabhängige Versuche mit *Cochliobolus sativus*-inokulierten Gerstenpflanzen durchgeführt, um die Induktion der Genexpression von *Bci-1* bis *Bci-9*, Klon 3-16 und *HvPr-1b* zu untersuchen. In einem Experiment wurden sieben Tage alte

Gerstenpflanzen (cv. Ingrid und *BCIngrid-mlo5*) mit *Cochliobolus sativus* inokuliert. Blattproben (unterschieden in 1., 2. und 3. Blatt, um systemische Effekte nachzuweisen) wurden nach 6 hpi und 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 und 14 dpi entnommen und *Northern Blot*-Analysen unterzogen. Eine Genaktivierung ließ sich nur für *HvPr-1b* in inokulierten Blättern nachweisen (s. Anhang, Abb. 8.9 A). In zwei Experimenten, in denen Primärblattsegmente sieben Tage alter Gerstenkeimlinge (cv. Ingrid und *BCIngrid-mlo5*) auf Agarplatten mit *Cochliobolus* inokuliert wurden, konnte das Ausbleiben einer Induktion der *Bci*-Gene für alle bestätigt werden. Eine Repression der Transkriptakkumulation konnte jedoch in beiden Experimenten für *Bci-8* und Klon 3-16 (Annexin-Homolog) festgestellt werden (s. Anhang, Abb. 8.9 B). In dem gezeigten Versuch wurden Blattproben nur zu einem Zeitpunkt (9 dpi) entnommen, in dem zweiten Versuch (ohne Abbildung) wurden Proben 8 hpi und 1, 2, 3 dpi geerntet und anschließend 'gepoolt'.

3.3.4.3 *Bci*-Genexpression nach Befall mit *Rhynchosporium secalis*

Zur Überprüfung der Induzierbarkeit der *Bci*-Gene durch ein weiteres nekrotrophes Pathogen wurden mit *Rhynchosporium secalis* befallene Blätter einer japanischen Gerstenmischkultur mit symptomlosen Feldproben in *Northern Blot*-Analysen verglichen. Nach Untersuchung der Genexpression von *Bci-4* bis *Bci-9* und den Klonen 1-62 und 3-16 konnte nur für *Bci-7* eine eindeutige Geninduktion durch *Rhynchosporium*-Befall nachgewiesen werden (Abb. 3.13). Klon 3-16 ist in befallenen Blättern leicht reprimiert und *Bci-8* erscheint in infizierten Blättern weniger stark exprimiert als in symptomlosen, wobei die ungleiche Beladung des Gels jedoch keine endgültige Aussage zulässt (Abb. 3.13).

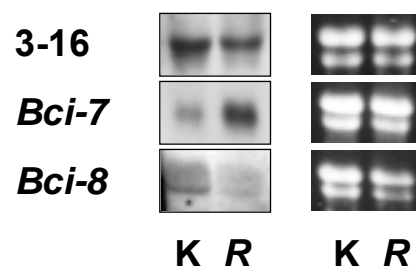


Abb. 3.13 Transkriptakkumulation der *Bci*-Gene in *Rhynchosporium secalis*-infizierten Blättern.

Aus dem Feldbestand einer japanischen Gerstenmischkultur wurden junge Blätter mit *Rhynchosporium*-Befall (R) und symptomlose Blätter als Kontrolle (K) geerntet und Gesamt-RNA extrahiert. Nach gelelektrophoretischer Trennung (10 µg RNA pro Spur) und Herstellung von *Northern Blots* wurde die mRNA mit Sonden von *Bci-4* bis *Bci-9* und von den Klonen 1-62 (*Hv14-3-3*) und 3-16 (Annexin-Homolog) unter stringenten Bedingungen hybridisiert. Die gleichmäßige RNA-Beladung des Gels wurde anhand EtBr-vermittelter Fluoreszenz der ribosomalen RNA unter UV-Licht überprüft und ist für den jeweils zugehörigen *Blot* neben dem Film gezeigt. Es sind nur die Ergebnisse der *Bci*-Gene dargestellt, die in infizierten Blättern differentiell exprimiert waren.

3.3.4.4 *Bci*-Genexpression nach Befall mit *Blumeria graminis* f.sp. *tritici* (*Bgt*)

Sechs Tage alte Gerstenpflanzen cv. Manchuria wurden mit 8 Konidien mm⁻² des Echten Weizenmehltaupilzes inokuliert. Nach 7, 24 und 48 hpi wurden Primärblätter geerntet und Genexpressionsanalysen für *Bci-1* bis *Bci-9* und *HvPr-1b* unterzogen. Eine Transkriptakkumulation der *Bci*-Gene durch die Inokulation mit *Bgt* konnte für keines der Gene nachgewiesen werden. Nur die Expression von *HvPr-1b* war ab 24 hpi durch das Nahe-Nicht-Wirt-Pathogen induziert (ohne Abbildung).

3.3.4.5 *Bci*-Genexpression nach Infiltration von Bakterien

Es wurden zwei Versuche zur Induktion der *Bci*-Gene im Vergleich zu *HvPr-1b* durch Injektion verschiedener Bakterienstämme in die Blätter durchgeführt. Im ersten Versuch wurden Bakteriensuspensionen in die Primärblätter von Gerstenpflanzen cv. Ingrid injiziert. Folgende Bakterien wurden verwendet: *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (DC3000), *P.s.* pv. *glycinea* (PG4180), *P.s.* pv. *syringae* (Pss61) und ein im Institut isolierter Stamm *Paenibacillus polymyxa* (E3). Nach 1 bis 6 dpi wurden Proben des infiltrierten ersten (lokale Effekte) und des nicht-infiltrierten zweiten Blattes (systemische Effekte) entnommen und in *Northern Blot*-Analysen mit Sonden für *HvPr-1b* und alle *Bci*-Gene außer *Bci-2* und *Bci-8* getestet. *HvPr-1b* Transkript akkumulierte nur nach 2 dpi im Primärblatt, in das DC3000, Pss61 oder E3 injiziert worden war (s. Anhang, Abb. 8.10). Die Genexpression korrelierte hier mit einer durch diese Bakterien verursachten starken Nekrosenbildung im infiltrierten Bereich, die ab 2 dpi auftrat und schon einen Tag davor als Chlorose sichtbar war. Im Gegensatz dazu verursachte eine Injektion mit PG4180 bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes nur Chlorosen im infiltrierten Bereich. Das Infiltrationsmedium alleine (5 mM MgSO₄) hatte keinen sichtbaren Einfluss auf das Blatt. Von den getesteten *Bci*-Genen reagierten *Bci-3* und *Bci-7* überhaupt nicht auf die Bakterien, alle anderen Gene nur sehr schwach. Für *Bci-1*, *Bci-5*, *Bci-6* und *Bci-9* wurde eine Transkriptakkumulation verstärkt im nicht-infiltrierten Sekundärblatt beobachtet. Zu späteren Zeitpunkten (4 und 6 dpi) konnte eine geringfügige Induktion durch DC3000 im Vergleich zur Kontrolle bei *Bci-1*, *Bci-5* und *Bci-9* festgestellt werden (s. Anhang, Abb. 8.10). Eine extrem geringe Induktion von *Bci-4* war in infiltrierten und nicht-infiltrierten Blättern durch PG4180 nach 2 dpi detektierbar (s. Anhang, Abb. 8.10).

In einem zweiten Experiment wurden Bakteriensuspensionen von DC3000, Pss61, PG4180 und *Bacillus subtilis* (Bs) in Primär- und Sekundärblätter von Gerstenpflanzen cv. Ingrid injiziert und anschließend infiltrierte und nicht-infiltrierte (systemische) Tertiär- und Quartärblätter geerntet. Die infiltrierten Blätter wurden vereinigt und in oberen (acropetalen, o), mittleren (Bereich der Injektion, m) und unteren (basipetalen, u) Bereich unterteilt. Die systemischen Blätter (s) wurden zusammen aufgearbeitet, da z.T. nur

geringe Mengen Blattmaterial zur Verfügung standen. *Northern*-Analysen bestätigten eine verstärkte *HvPr-1b* Transkriptakkumulation 1 dpi im infiltrierten Blattbereich (m) mit den stark nekrotisierenden *Pseudomonaden* DC3000 und Pss61 (Abb. 3.14). Die Genexpression von *Bci-1* wurde durch DC3000 1 dpi oberhalb des Infiltrationsbereiches (o) deutlich induziert (Abb. 3.13). *Bci-2*-Transkript war 1 dpi im oberen und mittleren Blattbereich (o, m) nach DC3000-Injektion und zu späten Zeitpunkten (4 und 6 dpi) im unteren Blattbereich (u) nach Bs-Infiltration detektierbar (Abb. 3.14). *Bci-3*-Transkript akkumulierte relativ schwach 1 dpi im oberen Blattbereich (o) nach Pss61 und DC3000, und 4 dpi nach PG4180 und Bs jeweils basipetal (u). Die Expression von *Bci-4* und *Bci-5* war sehr schwach 1 dpi basipetal (u) induziert, für *Bci-4* nach PG4180-Injektion wie im ersten Experiment, für *Bci-5* nach Bs-Injektion (Abb. 3.14). *Bci-6*-Transkript akkumulierte nicht nach Bakterien-Infiltration, *Bci-7* im Gegensatz zum ersten Experiment 1 dpi sehr stark und 2 dpi schwächer nach Injektion von DC3000 im oberen (o) und mittleren (m) Blattbereich (Abb. 3.14). Die Expression von *Bci-8* und *Bci-9* war 1 dpi sehr schwach im oberen Blattbereich induziert, bei *Bci-8* nach Injektion von Pss61 und bei *Bci-9* durch DC3000 (Abb. 3.14).

Zusammenfassend für beide Experimente lässt sich festhalten, dass die *Bci*-Genaktivierung durch die Bakterien sehr schwach war, meistens durch DC3000 ausgelöst wurde, die Reaktionen jedoch stark zwischen den Versuchen schwankten.

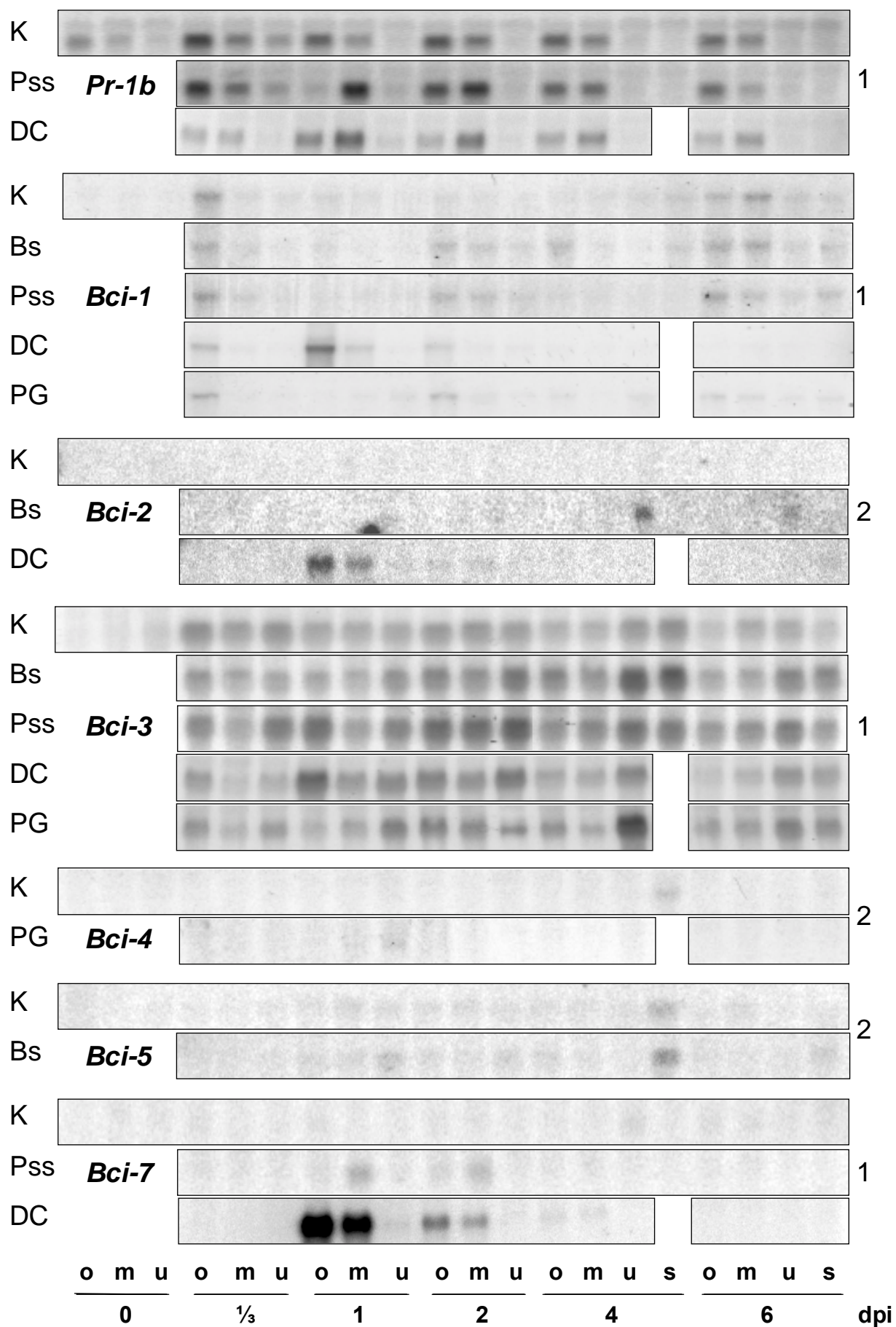


Abb. 3.14 Legende s. nächste Seite.

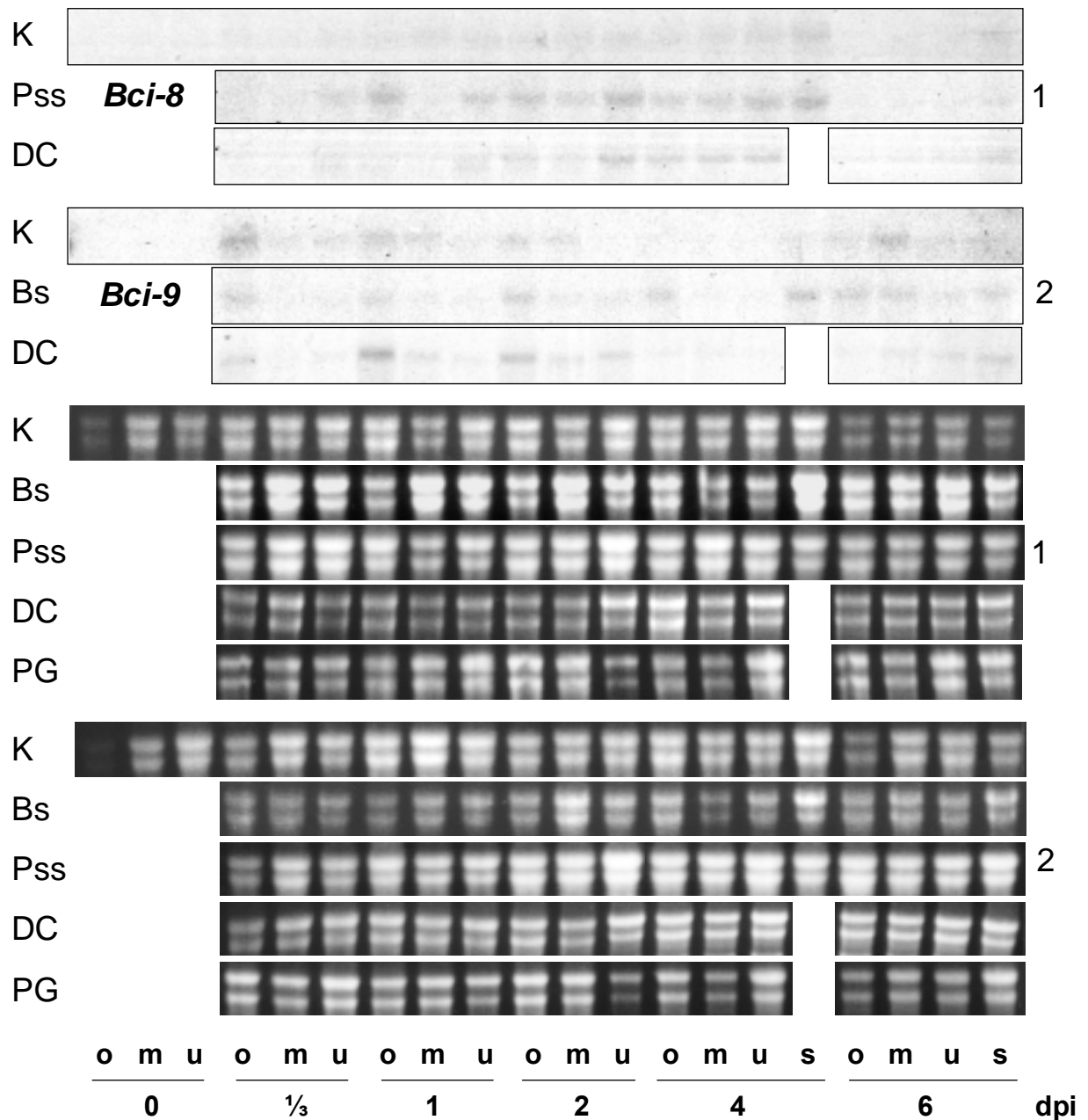


Abb. 3.14 Transkriptakkumulation der *Bci*-Gene und *HvPr-1b* nach Injektion verschiedener Bakterien.

Primär- und Sekundärblätter vierzehn Tage alter Gerstenkeimlinge cv. Ingrid wurden mit Suspensionen von *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (DC), *P.s.* pv. *syringae* (Pss), *P.s.* pv. *glycinea* (PG), *Bacillus subtilis* (Bs), bzw. mit 5 mM MgSO₄ (K) infiltriert. Die Blattproben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und in oberen (o), mittleren (m) und unteren (u) Bereich infiltrierter Blätter sowie nicht-infiltrierte Blätter (systemisch, s) unterteilt. Nach Extraktion von Gesamt-RNA, gelelektrophoretischer Trennung (10 µg RNA pro Spur) und Herstellung von *Northern Blots* wurde die mRNA mit radioaktiv markierten Sonden von *Bci-1* bis *Bci-9* und *HvPr-1b* unter stringenten Bedingungen hybridisiert. Die gleichmäßige RNA-Beladung des Gels wurde anhand EtBr-vermittelter Fluoreszenz der ribosomalen RNA unter UV-Licht überprüft. Ziffern rechts neben den Filmen und Gelen geben jeweils den zugehörigen *Blot* an. Es sind nur die Ergebnisse der *Bci*-Gene dargestellt, die in infiltrierten Blättern differenziell exprimiert waren.

3.3.4.6 *Bci*-Genexpression durch die Große Getreideblattlaus

Gerstenkeimlingen cv. Ingrid wurden mit ungeflügelten L4-Larvenstadien von *Sitobion avenae* beimpft, Primärblätter geerntet und Genexpressionsanalysen für *Bci-1* bis *Bci-9* und *Pr-1b* durchgeführt. Nach 7-tägigem Saugen der Blattläuse war eine differentielle Transkriptakkumulation von *HvPr-1b* und *Bci-1* nachweisbar (Abb. 3.15). Die *Bci-5* Expression wurde 5 dpi transient durch Blattlausbefall leicht reprimiert (Abb. 3.15), alle anderen Gene zeigten keine differentielle Expression.

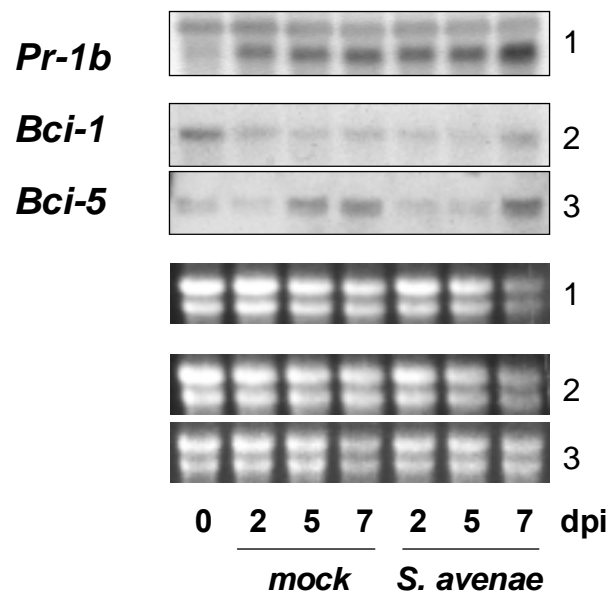


Abb. 3.15 Transkriptakkumulation der *Bci*-Gene im Vergleich zu *HvPr-1b* nach Blattlausbefall.

Acht Tage alte Gerstenkeimlinge cv. Ingrid wurden mit je 3 ungeflügelten L4-Stadien von *Sitobion avenae* F. (*S. avenae*) besetzt oder als Kontrollen nicht behandelt (*mock*). Nach 2, 5 und 7 dpi wurde Gesamt-RNA aus Primärblättern extrahiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt (10,5 µg RNA pro Spur). *Northern Blots* wurden mit Fluorescein- oder Digoxigenin-markierten Sonden von *Bci-3*, *Bci-4* und *Bci-5*, bzw. mit radioaktiv markierten Sonden aller übrigen *Bci*-Gene und von *HvPr-1b* unter stringenten Bedingungen hybridisiert. Die gleichmäßige RNA-Beladung des Gels wurde anhand EtBr-vermittelter Fluoreszenz der ribosomalen RNA unter UV-Licht überprüft. Ziffern rechts neben den Filmen und Gelen geben jeweils den zugehörigen *Blot* an. Es sind nur die Ergebnisse der *Bci*-Gene dargestellt, die in infizierten Blättern differentiell exprimiert waren.

3.3.5 *Bci*-Genexpression in anderen Getreiden

Zur Überprüfung einer Eignung der *Bci*-Gene als Markergene der cIR und um eine Aussage über die Vergleichbarkeit der Resistenzreaktionen in Getreide allgemein treffen zu können, wurde die heterologe Expression der Gene in Weizen und Reis nach chemischer Induktion untersucht.

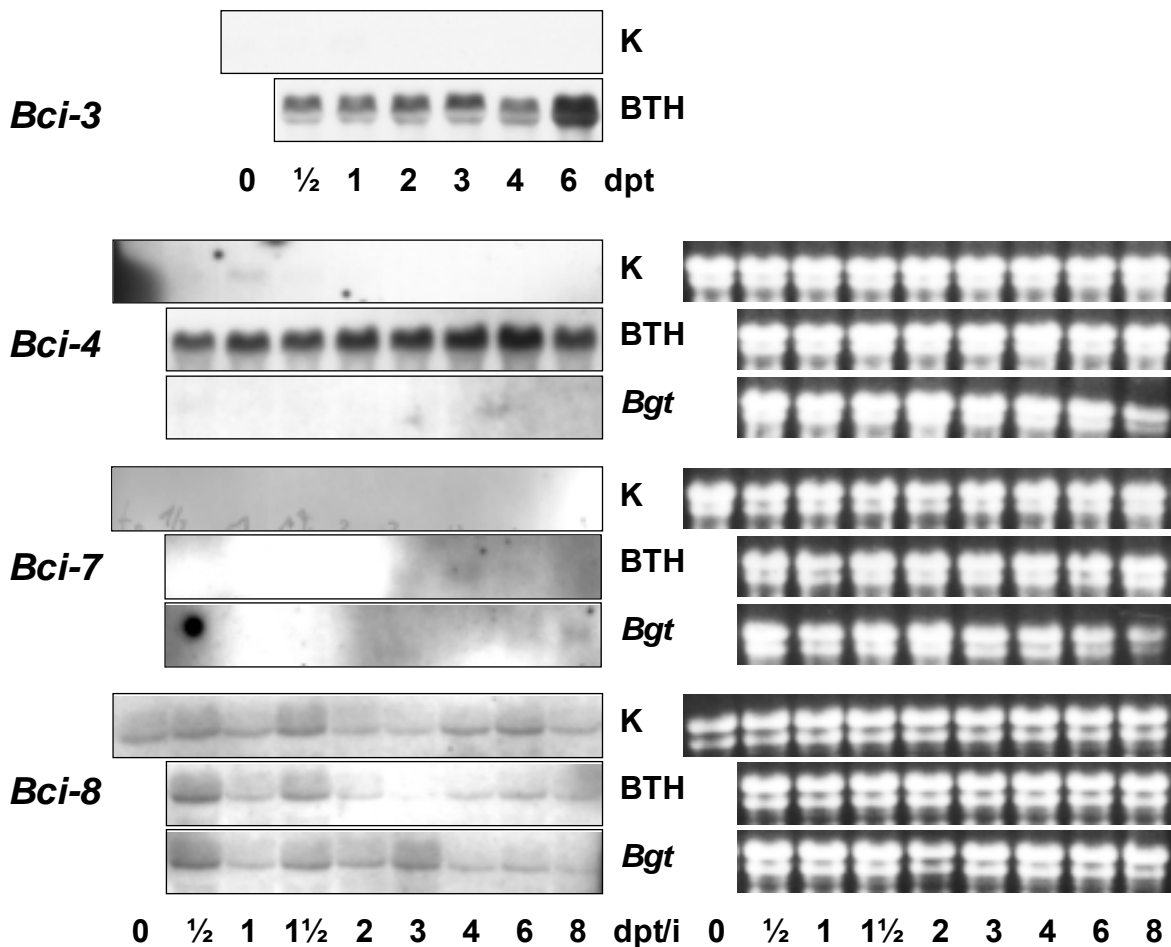


Abb. 3.16 Transkriptakkumulation der *Bci*-Gene nach BTH-Applikation oder *Bgt*-Inokulation von Weizenpflanzen.

Vierzehn Tage alte Weizenpflanzen cv. Kanzler wurden mit 100 mg L^{-1} BTH (BTH) oder zur Kontrolle mit der Leerformulierung WP (K) besprüht, bzw. mit Echtem Weizenmehltaupilz (*Bgt*) inokuliert. Sekundärblätter wurden zu den angegebenen Zeitpunkten (dpt/dpi) geerntet und Gesamt-RNA extrahiert. Nach gelelektrophoretischer Trennung (ca. $10 \mu\text{g}$ RNA pro Spur) und Herstellung von *Northern Blots* wurde die mRNA mit Sonden von *Bci-3* bis *Bci-9* unter weniger stringenten (60°C) Bedingungen hybridisiert als Gerstenproben. Die gleichmäßige RNA-Beladung des Gels wurde anhand EtBr-vermittelter Fluoreszenz der ribosomalen RNA unter UV-Licht überprüft und ist für den jeweils zugehörigen *Blot* neben dem Film gezeigt (nicht für *Bci-3*). Es sind nur die Ergebnisse der *Bci*-Gene dargestellt, die eine differentielle Expression zeigten.

3.3.5.1 *Bci*-Genexpression in Weizen (*Triticum aestivum* L.)

Sekundärblätter von Weizenpflanzen cv. Kanzler wurden mit 100 mg L^{-1} BTH besprüht, bzw. mit *Bgt* inokuliert und zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet. Bei dieser Interaktion von Echtem Mehltäupilz mit Weizen handelt es sich um ein Pathosystem, in dem die Wirkung von BTH als Resistenzinduktor bereits gezeigt wurde (Görlach *et al.* 1996). Die Proben wurden von Uli Beckhove, IPAZ Gießen, für Genexpressionsstudien von *Bci-3* bis *Bci-9* zur Verfügung gestellt. Keine Transkriptakkumulation war für *Bci-5*, *Bci-6* und *Bci-*

9 in Weizen nachweisbar. Eine deutliche Expression von *Bci-3* und *Bci-4* wurde über den gesamten Untersuchungszeitraum nach chemischer Induktion detektiert (Abb. 3.16). Im Gegensatz dazu hatte *Bgt* keinen Einfluss auf die Transkriptakkumulation beider Gene (nur für *Bci-4* gezeigt, Abb. 3.16). *Bci-7*-mRNA akkumulierte ab 3 dpt nach BTH-Applikation und 8 dpi nach Inokulation mit *Bgt* (Abb. 3.16). Das Genexpressionsmuster von *Bci-8* zeigte 3 dpt nach BTH-Behandlung eine leichte Repression und zum gleichen Zeitpunkt eine leichte Induktion nach *Bgt*-Inokulation (Abb. 3.16).

3.3.5.2 *Bci*-Genexpression in Reis (*Oryza sativa* L.)

Reispflanzen cv. Kusabue wurden mit 250 mg L⁻¹ BTH besprüht und die jüngsten voll entwickelten Blätter geerntet. Die Proben wurden von Ulrich Schaffrath, Institut für Pflanzenphysiologie (Biologie III), RWTH Aachen, für Genexpressionsstudien von *Bci-2* bis *Bci-9* zur Verfügung gestellt. Außer für *Bci-8* konnte kein (differentielles) Signal in *Northern*-Analysen detektiert werden (s. Anhang, Abb. 8.11).

Die Ergebnisse aller Induktionsanalysen der *Bci*-Genexpression durch die verschiedenen Behandlungen sind zusammenfassend in Tabelle 3.3 dargestellt.

Tab. 3.3 Induktionsprofile der *Bci*-Genexpression im Vergleich zu *Pr-1b*.

<i>Bci</i>	Sequenz	Gerste															Weizen		Reis
		DCINA	BTH	SA	JM	Sorbit	Ethylen	ABA	Verwundung	<i>Bgh</i> ¹	DCINA + <i>Bgh</i> ²	<i>Cochliobol. sativus</i>	<i>Rhynchospora secalis</i>	<i>Bgt</i>	Bakterien ³	<i>Sitobion avenae</i>	BTH	<i>Bgt</i>	BTH
	PR-1b	(↑)	(↑)	↑ ⁴	↑	↑	↑	–	–	↑ ⁵	nd	↑	nd	↑	↑	↑	– ⁶	↑ ^{6, 7}	0
1	Lipoxygenase	↑	↑	↑	↑	– ⁸	↑	–	–	– ⁹	– ⁹	–	nd	–	↑	↑	↑ ¹⁰	(↑) ¹⁰	0 ¹¹
2	Thionin	↑	↑	–	↑	–	(↓)	–	–	–	– ¹²	–	nd	–	↑	–	nd	nd	0
3	Saure Phosphatase	↑	↑	(↑)	↑	↓	–	–	(↑)	↓	– ¹²	–	nd	–	(↑)	–	↑	nd	0
4	EF-hand-Protein	↑	↑	↑	(↑)	–	–	–	–	–	↑	–	–	–	(↑)	–	↑	–	0
5	Plastidenspezif. ribosomales Protein	↑↓	↑↓	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	(↑)	(↓)	0	0	0
6	Saure Phosphatase	↑	↑	(↑)	↑	–	–	–	↑	↓	nd	–	–	–	–	nd	0	0	0
7	Serin-Proteinase-inhibitor	↑	↑	(↑)	↑	↑	↑	–	↑	↓	–	–	↑	–	↑	–	(↑)	(↑)	0
8	Fettsäuredesaturase	↓	(↓)	(↓)	↓	↓	–	–	(↓)	↑↓	–	↓	↓?	–	(↑)	–	↓?	↑	(↑)
9	Apyrase	↑	↑	–	↑	–	–	–	–	–	–	–	–	–	(↑)	–	0	0	–

↑ Aktivierung, ↓ Repression, () schwach differentiell oder nicht konsistent, ? nicht eindeutig, – nicht differentiell, 0 kein Signal detektiert (heterologes System), nd nicht determiniert. ¹Ohne Unterscheidung kompatibler und inkompatibler Interaktionen von *Bgh* mit Gerste. ²Bewertung eines zusätzlichen Effektes in induzierten Pflanzen durch *Bgh*. ³Ohne Unterscheidung verschiedener Bakterienstämme. ⁴Muradov *et al.* 1993. ⁵Bryngelsson *et al.* 1994. ⁶Molina *et al.* 1999. ⁷Görlach *et al.* 1996; ⁸Vörös *et al.* 1998. ⁹Schiffer, Dissertation 1998. ¹⁰Beckhove, Dissertation (in Vorbereitung). ¹¹Ulrich Schaffrath, persönliche Mitteilung. ¹²Jarosch, Dissertation (in Vorbereitung).

3.4 CHARAKTERISIERUNG VON *Bci-4*

Aufgrund der engen Korrelation zwischen chemischer Resistenzinduktion und Genexpression von *Bci-4* sowie der interessanten Sequenzähnlichkeit zu Ca^{2+} -bindenden Proteinen konzentrierte sich die weitere Arbeit auf dieses Protein.

3.4.1 Erzeugung des *full length*-Klons von *Bci-4*

Durch 3'-*RACE* (*rapid amplification of cDNA ends*) wurde in einer *hot start*-PCR ausgehend von einer 1:2500 verdünnten adapterligierten cDNA-Bank mit dem Adapterprimer 1 (AP1) und einem genspezifischen *sense*-Primer, der in der Reaktion in 3'-Richtung des Gens verlängert wird (*gsp2*), als Produkt eine Doppelbande von ca. 850 und 1000 bp Länge erhalten. Nach Klonierung der Bande in einen Vektor und Transformation in *E. coli* wurden die 24 Transformanten in einer Kolonie-PCR mit der gleichen Primerkombination (68 °C *annealing*-Temperatur) auf Integration des PCR-Produktes überprüft. Zur Kontrolle wurde mit den selben Kolonien eine PCR mit einem in 5'- und einem in 3'-Richtung orientierten Primer (*ngsp1* und *gsp2*) durchgeführt, mit denen ein Produkt von 106 bp amplifiziert wird. Es konnten 4 Klone identifiziert werden, von denen drei ein Produkt von ca. 850 bp und eine eines von ca. 1000 bp mit der Primerkombination AP1/*gsp2* ergaben. Gleichzeitig konnte von allen vier Klonen das erwartete Produkt von 106 bp mit dem Primerpaar *ngsp1/gsp2* amplifiziert werden. Es wurden Plasmidpräparationen durchgeführt und die Basenabfolge sequenziert. Das *Alignment* der Sequenzen ist im Anhang gezeigt (s. Abb. 8.12). Die verlängerte Sequenz von Klon 2 beruht auf einem längeren nicht-kodierenden 3'-Ende nach dem in allen Sequenzen konservierten Stopcodon (TGA).

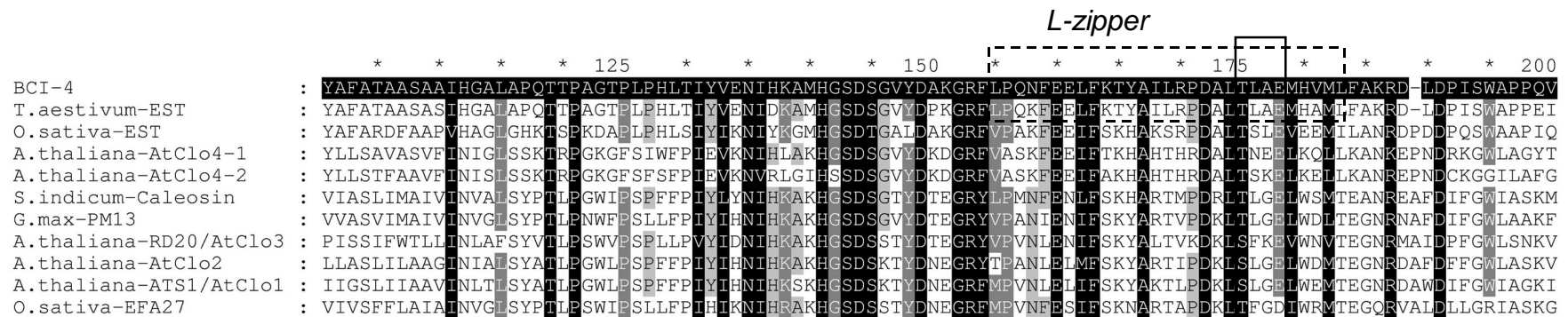
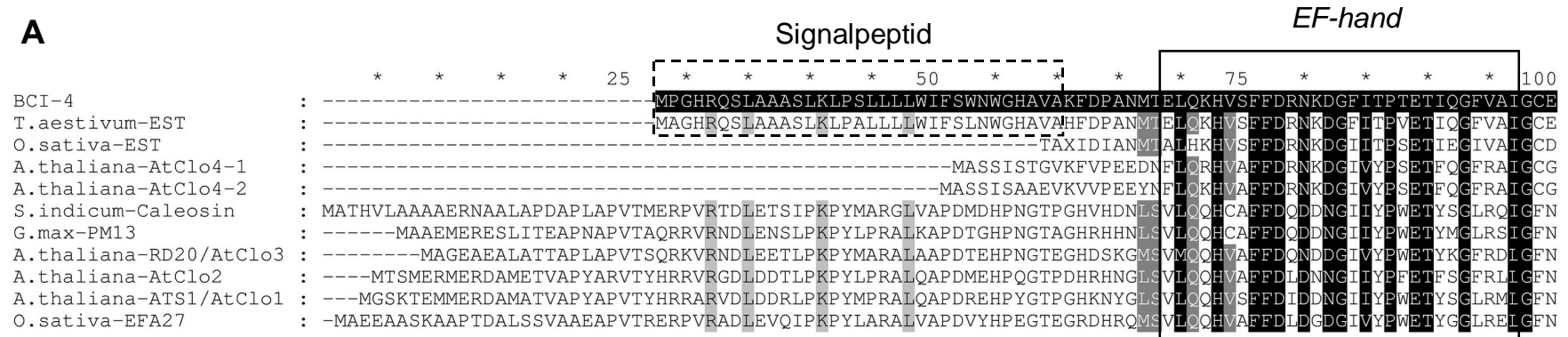
Durch 5'-*RACE* wurde in einer dem 3'-*RACE* entsprechenden Reaktion mit dem Adapterprimer 1 (AP1) und einem genspezifischen *antisense*-Primer, der in der Reaktion in 5'-Richtung des Gens verlängert wird (*ngsp1*), als Produkt eine Bande von ca. 250 bp Länge erhalten. Nach Klonierung der Bande in einen Vektor und Transformation in *E. coli* wurden 51 Transformanten in einer Kolonie-PCR mit der gleichen Primerkombination (68 °C *annealing*-Temperatur) auf Integration des PCR-Produktes überprüft. Zusätzlich wurde eine Kontrolle mit *ngsp1/gsp2*-Primern durchgeführt (s.o.). Die Sequenzierung von fünf Klonen aus zwei *RACE*-PCR Ansätzen und deren *Alignment* mit der bereits vorhandenen Sequenz des cDNA-Fragmentes ergaben keine Sequenzinformationen, die über das schon bekannte 5'-Ende hinaus gingen (s. Anhang, Abb. 3.13 und 3.14). Es konnte jedoch ein Stopcodon (TAG) vor dem ersten möglichen Startcodon (ATG) im selben Leseraster bestätigt werden (s. Anhang, Abb. 8.14), so dass keine weiteren *RACE*-Experimente durchgeführt wurden. Aus den Ergebnissen der 3'- und 5'-*RACE*-Experimente wurde die virtuelle Sequenz von *Bci-4* ermittelt (s. Anhang, Abb. 8.15).

Die komplette vom offenen Leseraster (*open reading frame*, ORF) abgeleitete Proteinsequenz von 217 Aminosäuren bedingt ein errechnetes Molekulargewicht von 24,3 kD für BCI-4 und einen isoelektrischen Punkt von ca. 6,8. Die Ähnlichkeit zu dem *Arabidopsis*-Protein unbekannter Funktion (Caleosin AtClo4-1, Acc. Nr. AAG52340) erhöht sich für den gesamten ORF auf einen blast/x-Wert von $7e^{-37}$ bei 87/176 (49 %) identischen und 104/176 (58 %) positiven Aminosäuren. Die nächst ähnliche Sequenz ist die eines Caleosins aus Sesam (*Sesamum indicum*, Acc. Nr. AAF13743, blast/x $6e^{-34}$, 76/165 [46 %] identische Aminosäuren). In Abbildung 3.17 ist ein *Alignment* von BCI-4 mit einer Auswahl ähnlicher Proteinsequenzen gezeigt, in dem zusätzlich die wichtigsten Motive markiert sind. Über alle Sequenzen konservierte Motive sind das Ca^{2+} -bindende *single EF-hand* und eine Caseinkinase II-Phosphorylierungsstelle. Ein putatives Signalpeptid (Spaltungsstelle zwischen Aminosäuren 33 und 34) und zwei sich überlappende Leucin-*zipper* sind nur in BCI-4 und im abgebildeten Weizenklon vorhanden.

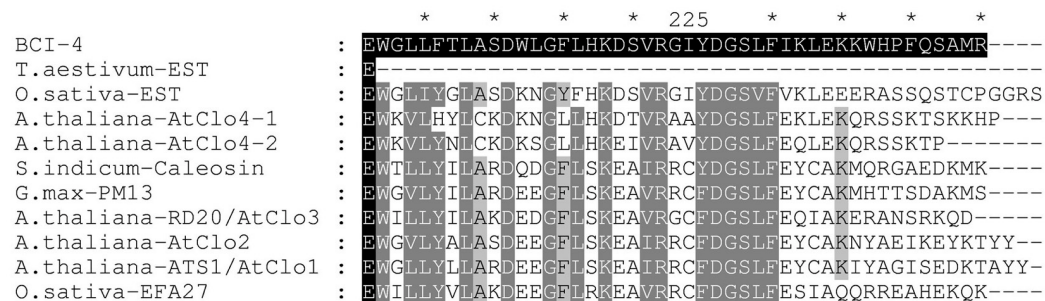
Zur Darstellung des tatsächlichen ORF von *Bci-4* wurde eine RT-PCR ausgehend von Gesamt-RNA aus chemisch induzierten Gerstenkeimlingen (250 mg L⁻¹ BTH gesprüht, 24 hpt) mit spezifischen Primern durchgeführt, die von der Sequenzinformation (s. Anhang, Abb. 8.15) abgeleitet wurden und den kompletten ORF umspannen. Die Primer wurden so gewählt, dass sie zusätzlich eine Restriktionsschnittstelle enthielten, um spätere Klonierungsschritte zu erleichtern. In einem Fall war das Startcodon in der Primersequenz enthalten (ORF1), im anderen Fall hingegen fehlte es (ORF2). Mit beiden Primerkombinationen wurde ein Produkt von ca. 690 bp Größe amplifiziert, nach Gelextraktion kloniert, in *E. coli* transformiert und zur Überprüfung der Basenabfolge jeweils von beiden Richtungen vom Plasmid sequenziert. Die Sequenzen der weiter verwendeten Klone ORF1 und ORF2 bestätigten jeweils die Sequenzinformationen, die nach *RACE* bereits zur Verfügung standen (s. Anhang, Abb. 8.16). Geringfügige Ungenauigkeiten beruhen auf Sequenzierfehlern, ein möglicher *frameshift* am 3'-Terminus von ORF2 (ein zusätzliches G an Position 666) liegt hinter dem Stopcodon und ist somit irrelevant.

Mit genomischer DNA (ca. 200 ng) einer *Mlg*-tragenden Gerstenlinie (*BCIngrid-Mlg*) wurde mit den ORF1-Primern ein PCR-Produkt von ca. 2,8 kbp erhalten und in *E. coli* kloniert. Im 5'- und 3'-Ende des ORF konnten bislang vier Exons definiert werden (1-83, 84-197, 377-501, 502-651 bp, ohne Abbildung).

A



CKII-Phosp.



B

BCI-4 EF-hand-Motiv:

ELQKHVSFFDRNKDGFITPTETIQGFVAI

***n**nn**nx*y*zG*Ix**zn**nn**n**

Helix

Turn

Helix

Abb. 3.17 Alignment von BCI-4 mit Proteinen ähnlicher Sequenz.

A Die abgeleitete Aminosäuresequenz von BCI-4 ist im Vergleich zu ähnlichen Proteinen bzw. abgeleiteten Sequenzen von ESTs gezeigt. Die Reihenfolge von oben nach unten gibt den absteigenden Grad der Ähnlichkeit an. Die Sequenzen sind (mit Accession Nr.): ein EST aus Weizen (*T. aestivum*, BE430024), ein EST aus Reis (*O. sativa*, AW070113), fünf Caleosine aus *Arabidopsis* (*A. thaliana*, AtClo4-1 AAG52340 und AtClo4-2 AAG52337, RD20/AtClo3 AAB80656, AtClo2 BAB08593, ATS1/AtClo1 AAC27072; Næsted *et al.* 2000), ein Caleosin aus Sesam (*S. indicum*, AAF13743, Chen *et al.* 1999), ein *EF-hand* Protein aus Soja (*G. max* PM13, AAB71227, Chow *et al.* 1997) und ein *EF-hand*-Protein aus Reis (*O. sativa* CAA61981, Frandsen *et al.* 1996). Konservierte zu BCI-4 identische oder ähnliche Aminosäuren sind grau unterlegt. Über alle Sequenzen konservierte Motive sind das Ca^{2+} -bindende *single EF-hand* und eine Caseinkinase II-Phosphorylierungsstelle (CKII-Phosph.), jeweils mit durchgezogener Linie umrandet. Ein putatives Signalpeptid und zwei sich überlappende Leucin (L)-*zipper* sind nur in BCI-4 und im Weizenklon vorhanden und mit gestrichelter Linie umrandet. **B** Das *EF-hand*-Motiv von BCI-4 ist im Vergleich zu dem konservierten Motivmuster (Moncrief *et al.* 1990) gezeigt: *: jegliche; x, y, z: O_2 -enthaltende, Ca^{2+} -bindende; n: hydrophobe (Abweichung H, T, fett gedruckt) Aminosäure.

3.4.2 Herstellung des rekombinanten Proteins von *Bci-4*

Zur weiteren Charakterisierung von *Bci-4* und zur Antikörperherstellung wurde ein rekombinantes Protein hergestellt. Der in 3.4.1 gewonnene Klon ORF2 (*full length*-Klon von *Bci-4* ohne Startcodon) wurde in den Expressionsvektor pQE30 (Qiagen, Hilden) kloniert (über die Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Hind*III) und in *E. coli* (M15, Qiagen, Hilden) transformiert. Der Expressionsvektor (pQE30-ORF2) enthält damit einen ORF, der für ein rekombinantes Protein aus 228 aa mit einem Molekulargewicht von 25,5 kD codiert, und an seinem N-Terminus den *6xHis-tag* aufweist. Von acht in einer Kolonie-PCR (Primerkombination M13*universe* und M13*reverse*, *annealing*-Temperatur 58°C) überprüften Klonen wurden vier ausgewählt, mit denen Expressionskulturen angeimpft wurden. Vor der Induktion der Proteinexpression mit IPTG und 2-4 h danach wurden Aliquots der Bakterienkulturen entnommen und nach Aufschluss mit einer schnellen Aufarbeitungsmethode (s. 2.9.3) die Akkumulation des Proteins in SDS-Polyacrylamidgelen mit Hilfe einer Coomassie-Färbelösung überprüft. Eine deutliche und mit der Zeit zunehmende Proteinakkumulation war in der Bakterienkultur mit dem pQE30-ORF2-Vektor im Vergleich zur Kontrolle (Bakterien mit leerem pQE30-Vektor) in der Pelletfraktion bei ca. 25 kD nachweisbar (s. Anhang, Abb. 8.17).

Zur Aufreinigung des rekombinanten Proteins wurde das Protokoll für einen Zellaufschluss unter denaturierenden Bedingungen (*The QIAexpressionistTM, 3rd edition*, Qiagen, Hilden) leicht modifiziert und mit 8 M GuHCl-Lysepuffer durchgeführt, nachdem sich gezeigt hatte, dass 8 M Harnstoff das BCI-4-Protein nicht und 6 M GuHCl nur teilweise aus dem Zellpellet extrahieren konnte (s. Anhang, Abb. 8.18). Über eine Ni-NTA-Agarosesäule

(Qiagen, Hilden) wurde das rekombinante Protein durch Bindung der Histidinreste des *6xHis-tag* und nachfolgender Elution mittels pH *shift* gemäß Anleitung angereichert. Die einzelnen Fraktionen Bakterienzellpellet, Überstand, Säulendurchfluss, Waschfraktionen und Eluate von Elutionspuffer D (pH 5,9) bzw. E (pH 4,5) wurden in SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Nach Coomassie-Färbung war die Aufreinigung des rekombinanten Proteins nach Elution besonders in Puffer D deutlich erkennbar (Abb. 3.18).

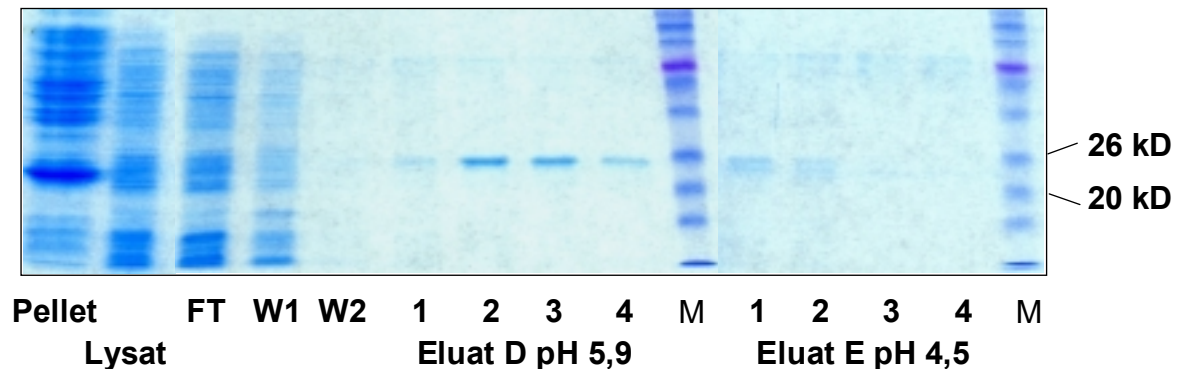


Abb. 3.18 Aufreinigung des rekombinanten BCI-4-Proteins über Ni-NTA-Agarose.

Expressionskulturen wurden mit Klon pQE30-ORF2 enthaltenden Bakterien angeimpft und 4 hpt nach Induktion der Expression des rekombinanten Proteins pelletiert. Proben wurden nach der Aufarbeitung unter denaturierenden Bedingungen über eine Ni-NTA-Agarosesäule aufgereinigt. Die einzelnen Fraktionen Bakterienzellpellet (Pellet), Überstand (Lysat), Säulendurchfluss (FT, *flow through*), Waschschritt 1 und 2 (W1, W2) und Eluate 1-4 von Elutionspuffer D (pH 5,9) bzw. E (pH 4,5) wurden in SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und die Akkumulation von Protein mittels Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Als Molekularmarker (M) wurde ein vorgefärbter Proteinstandard (9-182 kD) verwendet.

Für die Herstellung von Anti-BCI-4-Antikörpern wurden Fraktionen der Eluate D und E verwendet, indem eine Doppelbande in der entsprechenden Größe aus einem SDS-Polyacrylamidgel nach Coomassie-Färbung ausgeschnitten und in ein Immunisierungsprogramm für Kaninchen eingesetzt wurde.

3.4.3 Genexpression von *Bci-4*

Zur detaillierteren Charakterisierung von *Bci-4* wurden zusätzliche Genexpressionsstudien sowohl auf Transkript-, als auch auf Proteinebene durchgeführt.

3.4.3.1 Chemische Induktion der *Bci-4*-Expression

Zunächst ist die vergleichende Untersuchung der Geninduktion nach Applikation der Resistenzinduktoren SA, DCINA und BTH in einem *Northern* und einem *Western Blot*

gezeigt (Abb. 3.19). Es wurden Blattproben des unter 3.1.2.2 beschriebenen Experimentes (Abb. 3.3) zur Untersuchung der resistenzinduzierenden Wirkung chemischer Induktoren verwendet. Für den Nachweis der Akkumulation von *Bci-4*-Transkript gingen alle Erntezeitpunkte der Gerstenlinien cv. Ingrid und der Mutante A89, für den Nachweis von BCI-4-Protein nur ein Zeitpunkt (2 dpt) und nur die Sorte Ingrid in die Untersuchung ein. In beiden Gerstenlinien ist die differentielle Akkumulation des *Bci-4*-Transkriptes durch Applikation der chemischen Induktoren gleichermaßen von 1-4 dpt deutlich zu erkennen (Abb. 3.19 A). Die Aktivierung der Genexpression durch den natürlichen Resistenzinduktor SA ist im Vergleich zu den synthetischen Induktoren DCINA und BTH etwas schwächer und transient. Auf Proteinebene lassen sich dagegen keine Unterschiede zwischen SA, DCINA und BTH zwei Tage nach der Behandlung beobachten (Abb. 3.19 B). Die induzierte Proteinakkumulation von BCI-4 ist mit zwei verschiedenen Antikörpern nachweisbar, wobei eine schwache Bande in den Kontrollen auf eine geringe konstitutive Expression von BCI-4 hindeutet.

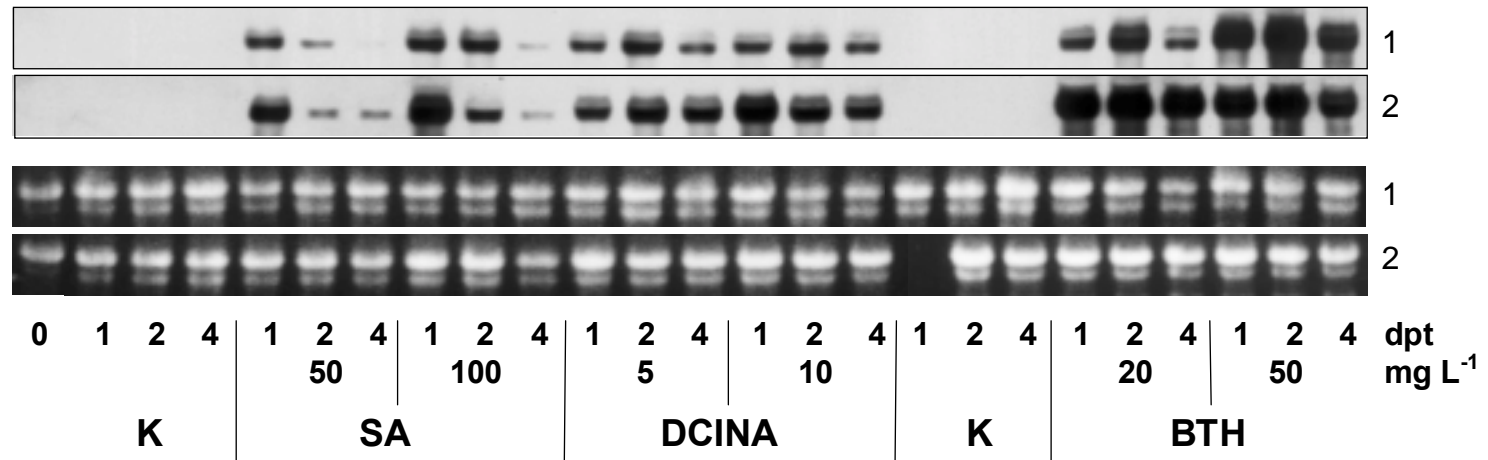
Die vom Genotyp der Gerstenpflanze unabhängige Induktion der *Bci-4* Genexpression in Abhängigkeit von der Dosis des chemischen Induktors (DCINA) wurde in einem weiteren Experiment mit den Linien cv. Ingrid, *BCIngrid-mlo5* und A89 gezeigt (s. Anhang, Abb. 8.19). Eine deutliche Induktion von *Bci-4* erfolgte ab einer Konzentration von 5 mg L^{-1} DCINA bei allen Genotypen, unabhängig vom *Mlo*-Locus. Auf Proteinebene wurde dieses Ergebnis für chemisch induzierte Gerste bestätigt, die die Resistenzgene *mlo5* bzw. *Mla12* tragen bzw. deren jeweilige für diesen Signalweg benötigten Elemente defekt waren (*ror*- bzw. *rar*-Mutanten) (ohne Abbildung).

Abb. 3.19 Chemisch induzierte Genexpression von *Bci-4*. Abb. s. nächste Seite.

Fünf Tage alte Gerstenkeimlinge cv. Ingrid bzw. der Mutante A89 wurden mit den angegebenen Konzentrationen (mg L^{-1}) der chemischen Induktoren (SA, DCINA, BTH) jeweils bezogen auf das Bodenvolumen gegossen und 1 bis 4 dpt Primärblätter geerntet. Kontrollbehandlung (K) erfolgte durch Gießen einer 1 %iger DMF- (SA, DCINA) bzw. WP-Lösung (BTH). **A** Nach Extraktion von Gesamt-RNA, gelelektrophoretischer Trennung (je $10 \mu\text{g}$ RNA pro Spur) und Herstellung von *Northern Blots* wurde die mRNA mit *Bci-4*-Sonde hybridisiert. Die gleichmäßige RNA-Beladung des Gels wurde anhand EtBr-vermittelter Fluoreszenz der ribosomalen RNA unter UV-Licht überprüft. Ziffern rechts neben den Filmen und Gelen geben jeweils den zugehörigen *Blot* an. **B** Nach Extraktion von Protein aus Gerstenblättern cv. Ingrid 2 dpt nach Applikation der chemischen Induktoren, SDS-PAGE ($20 \mu\text{g}$ Protein pro Spur) und Herstellung von *Western Blots* wurde BCI-4 Protein mit Anti-BCI-4-Antikörpern (8457, 8458) hybridisiert. Als Molekularmarker (M) wurde ein vorgefärbter Proteinstandard (9-182 kD) verwendet.

A

**cv. Ingrid
A89**



B

cv. Ingrid

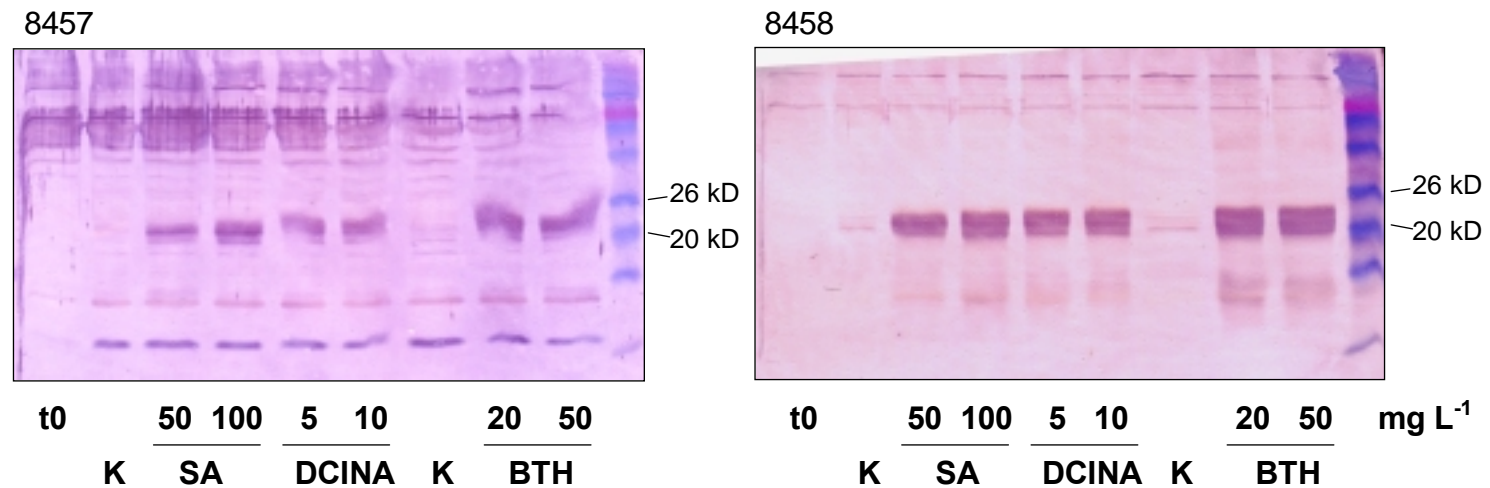


Abb. 3.19 Chemisch induzierte Genexpression von *Bci-4*. *Legende s. vorherige Seite.*

3.4.3.2 Gewebespezifische Expression nach chemischer Resistenzinduktion

Die Expression von *Bci-4* wurde in verschiedenen Entwicklungsstadien bzw. in verschiedenen Pflanzenteilen der Gerste cv. Ingrid untersucht. Dazu wurden Embryonen aus einem Tag vorgekeimten Körnern präpariert sowie Wurzelgewebe 10 Tage alter Keimlinge, Blätter verschiedener Blattetagen (Primär-, Sekundär-, Quartärblätter [Beginn der Bestockung]) und 4 Monate nach Aussaat Fahnenblätter, Halme und Ähren (Beginn des Ährenschiebens) jeweils unbehandelt und nach BTH-Applikation geerntet. Die Gießbehandlung mit BTH erfolgte jeweils drei Tage vor der Ernte. Es wurde sowohl RNA als auch Protein extrahiert. Daneben wurde interzelluläre Waschflüssigkeit (IWF) von Primärblättern chemisch induzierter Gerstenpflanzen cv. Ingrid zwei Tage nach der Applikation von BTH gewonnen. Mit *Bci-4*-Sonde bzw. Anti-BCI-4-Antikörper wurde die Genexpression von *Bci-4* untersucht (Abb. 3.20 A und B).

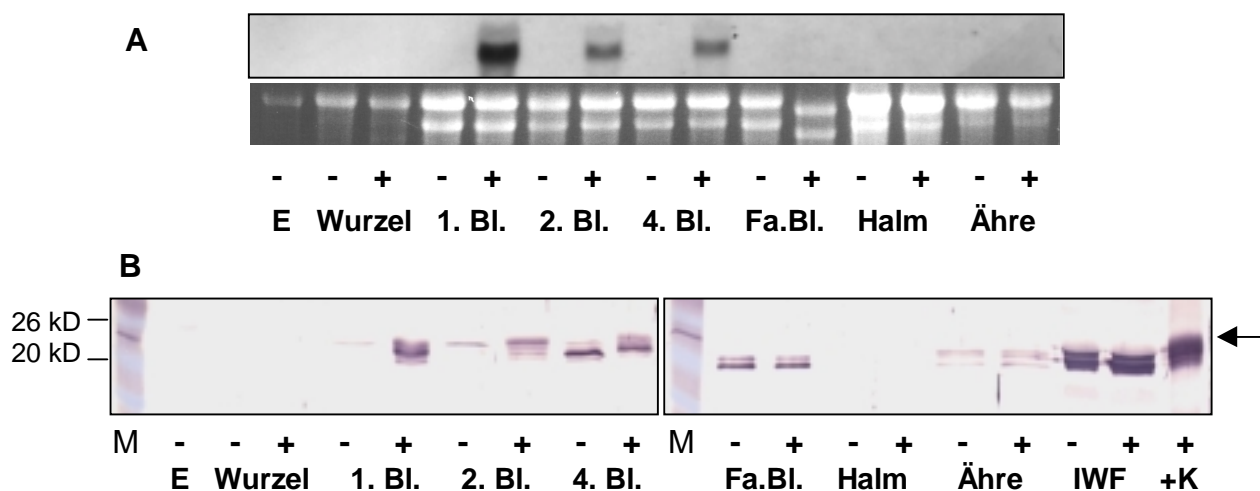


Abb. 3.20 Genexpression von *Bci-4* in verschiedenen Pflanzenteilen.

Folgende Gewebe wurden im Laufe der Entwicklung von Gerstenpflanzen cv. Ingrid geerntet: Embryo E (ein Tag vorgekeimt), Wurzel (10 Tage nach Aussaat), Primär- (1. Bl.), Sekundär- (2. Bl.), Quartärblatt (4. Bl., Beginn der Bestockung), Fahnenblatt (Fa.Bl., 4 Monate nach Aussaat), Halm und Ähre (Beginn des Ährenschiebens, 4 Monate nach Aussaat). Jeweils drei Tage vor der Ernte erfolgte eine Gießbehandlung mit 20 mg L⁻¹ BTH (+) bezogen auf das Bodenvolumen, oder keine Behandlung (-). Interzelluläre Waschflüssigkeit (IWF) wurde zwei Tage nach der Applikation von 20 mg L⁻¹ BTH (+), bzw. der äquivalenten Menge der Leerformulierung (WP, -) bezogen aus das Bodenvolumen aus sieben Tagen alten Gerstenpflanzen cv. Ingrid gewonnen. **A** Nach Extraktion von Gesamt-RNA, gelelektrophoretischer Trennung (10,5 µg RNA pro Spur) und Herstellung von *Northern Blots* wurde die mRNA mit *Bci-4*-Sonde hybridisiert. Die gleichmäßige RNA-Beladung des Gels wurde anhand EtBr-vermittelter Fluoreszenz der ribosomalen RNA unter UV-Licht überprüft. **B** Nach Extraktion von Protein, SDS-PAGE (20 µg Protein pro Spur) und Herstellung von *Western Blots* wurde BCI-4-Protein mit Anti-BCI-4-Antikörpern (8458) hybridisiert. Als Molekularmarker (M) wurde ein vorgefärbter Proteinstandard (9-182 kD), als positiv Kontrolle (+K) ein bereits überprüfter Proteinextrakt eines induzierten Blattes verwendet. Der Pfeil bezeichnet die Lage des spezifischen BCI-4-Proteins.

Auf Transkriptebene konnte eine Akkumulation von *Bci-4* nur in vegetativen Blättern nach chemischer Induktion nachgewiesen werden (Abb. 3.20 A). Im *Western Blot* wurde dieses Ergebnis prinzipiell bestätigt, der Antikörper detektiert in Blättern jedoch zusätzlich unspezifische Proteine, die als starke Signale sichtbar, aber kleiner als BCI-4 sind (Abb. 3.20 B). In der IWF induzierter Blätter ist keine differentielle Akkumulation von BCI-4 im Vergleich zur Kontrolle nachweisbar, allerdings eine starke Kreuzreaktion mit konstitutiven Proteinen sichtbar (Abb. 3.20 B).

In *Northern*-Analysen von in Epidermis und Mesophyll getrennter Blattgewebe hatte sich herausgestellt, dass nach chemischer Induktion mit BTH *Bci-4*-Transkript nur im Mesophyll stark akkumulierte (Abb 3.6). Dieses Ergebnis sollte auf Proteinebene in *Western*-Analysen überprüft werden. Dazu wurde die abaxiale Epidermis der Primärblätter zu verschiedenen Zeitpunkten nach der BTH-Gießbehandlung von Gerstenkeimlingen cv. Ingrid abgezogen und getrennt vom restlichen Blatt (Mesophyll und adaxiale Epidermis) aufgearbeitet. In Abbildung 3.21 wird deutlich, dass auch das BCI-4-Protein nach BTH-Applikation nur zu den späteren Zeitpunkten (24 und 48 hpt) im Mesophyll akkumuliert. Allerdings wurde neben der (unspezifischen) Detektion verschiedener kleinerer Proteine möglicherweise eine schwache konstitutive Expression von BCI-4 sowohl im Mesophyll als auch in der Epidermis detektiert (Abb. 3.21).

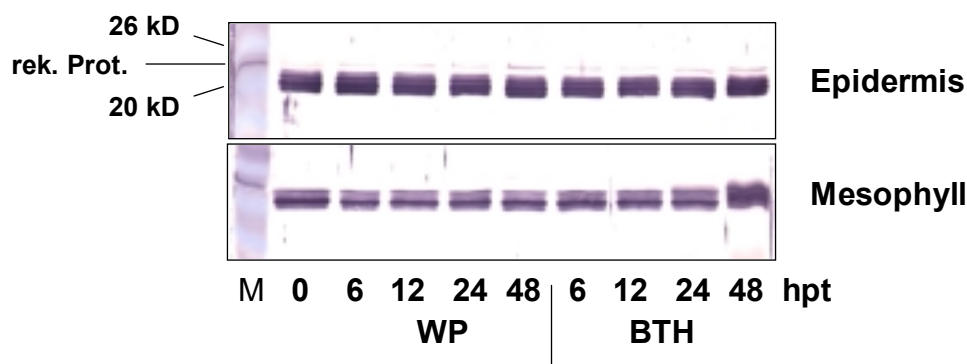


Abb. 3.21 BCI-4-Proteinakkumulation in Epidermis und Mesophyll von Primärblättern nach BTH-Applikation.

Sechs Tage alte Gerstenkeimlinge cv. Ingrid wurden mit 20 mg L^{-1} BTH bezogen auf das Bodenvolumen oder mit der Leerformulierung WP gegossen. Primärblätter der Gerstenpflanzen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten (hpt) geerntet, die abaxiale Epidermis vom restlichen Blatt (Mesophyll) getrennt und Protein extrahiert. Nach gelelektrophoretischer Trennung ($20 \mu\text{g}$ Protein pro Spur) und Herstellung von *Western Blots* wurde BCI-4-Protein mit Anti-BCI-4-Antikörpern (8458) hybridisiert. Als Molekularmarker (M) wurde ein vorgefärbter Proteinstandard (9-182 kD) verwendet, der mit dem rekombinanten Protein von BCI-4 verunreinigt war (rek. Prot.).

3.4.3.3 Pathogeninduzierte Expression von *Bci-4*

In *Northern Blot*-Analysen konnte die Akkumulation von *Bci-4*-Transkript nach Inokulation von Gerstenpflanzen mit dem Echten Mehltapilz (*Bgh*) weder in der kompatiblen noch in verschiedenen inkompatiblen Interaktionen nachgewiesen werden (s. 3.3.4.1.1). Zum Einen sollte dieses Ergebnis in *Western Blot*-Analysen, zum Anderen mit der sensitiveren Methode der RT-PCR betätigt werden. Dazu wurden resistente Gerstenpflanzen *BCIngrid-Mlg*, die den gleichen Abwehrphänotyp gegenüber *Bgh* aufweisen wie chemisch induzierte Pflanzen (Bildung effektiver Papillen, begleitet von einer HR der attackierten Epidermiszelle), auf der abaxialen Seite ihrer Primärblätter mit *BghA6* inokuliert. Nach 8, 15 und 25 hpi wurde jeweils die abaxiale Epidermis vom restlichen Blatt getrennt und RNA bzw. Protein extrahiert.

In *Northern Blots* wurde zunächst die Induktion von *HvPr-1b* in inokulierten Proben als Marker für Pathogenbefall überprüft (Abb. 3.22 C). Besonders im Mesophyll war 25 hpi eine starke *HvPr-1b*-Genexpression nachweisbar.

Mit Anti-BCI-4-Antikörpern konnte in *Western Blot*-Analysen im Vergleich zur positiv-Kontrolle (+K, chemisch induziertes Blatt) nur eine schwache konstitutive Bande mit der Größe von BCI-4 detektiert werden (Abb. 3.22 A). Die Inokulation mit *Bgh* hatte keinen Einfluss auf das Bandenmuster. Dieses Ergebnis wurde durch eine RT-PCR bestätigt. Mit genspezifischen Primern (ORF1) wurde ausgehend von 500 ng Gesamt-RNA *Bci-4*-cDNA synthetisiert und in 23 PCR-Zyklen amplifiziert. Nach elektrophoretischer Trennung der PCR-Produkte, von denen nur das der positiv-Kontrolle im EtBr-Gel sichtbar war, wurden diese anschließend wie für *Reversed Northern*-Analysen beschrieben auf Nylonmembranen 'geblottet'. Die *Blots* wurden anschließend mit *Bci-4*-Transkriptsonde unter stringenten Bedingungen bei 68 °C hybridisiert. Es zeigte sich ein konstitutives Signal in der Epidermis und im Mesophyll, was im Vergleich zur positiv-Kontrolle extrem schwach ausfiel und nicht durch Echten Mehltau induziert wurde (Abb. 3.22 B). In einer unabhängigen RT-PCR (100 ng RNA, 45 PCR-Zyklen) wurde dieses Ergebnis mit 'gepoolten' Proben inokulierter ganzer Blätter (je *mock* und *Bgh*, 6, 12, 24, 48 hpi) für die Interaktion von *BghA6* mit Gerste cv. Ingrid, *BCIngrid-Mlg*, *BCIngrid-Mla12* und *BCIngrid-mlo5* bestätigt. Die Menge der PCR-Produkte von *mock*- bzw. *Bgh*-inokulierten Proben wurden in diesem Fall über das Gelbild mit einer positiv-Kontrolle von induzierten Pflanzen verglichen. Es konnte keine differentielle Expression von *Bci-4* durch Inokulation nachgewiesen werden (ohne Abbildung).

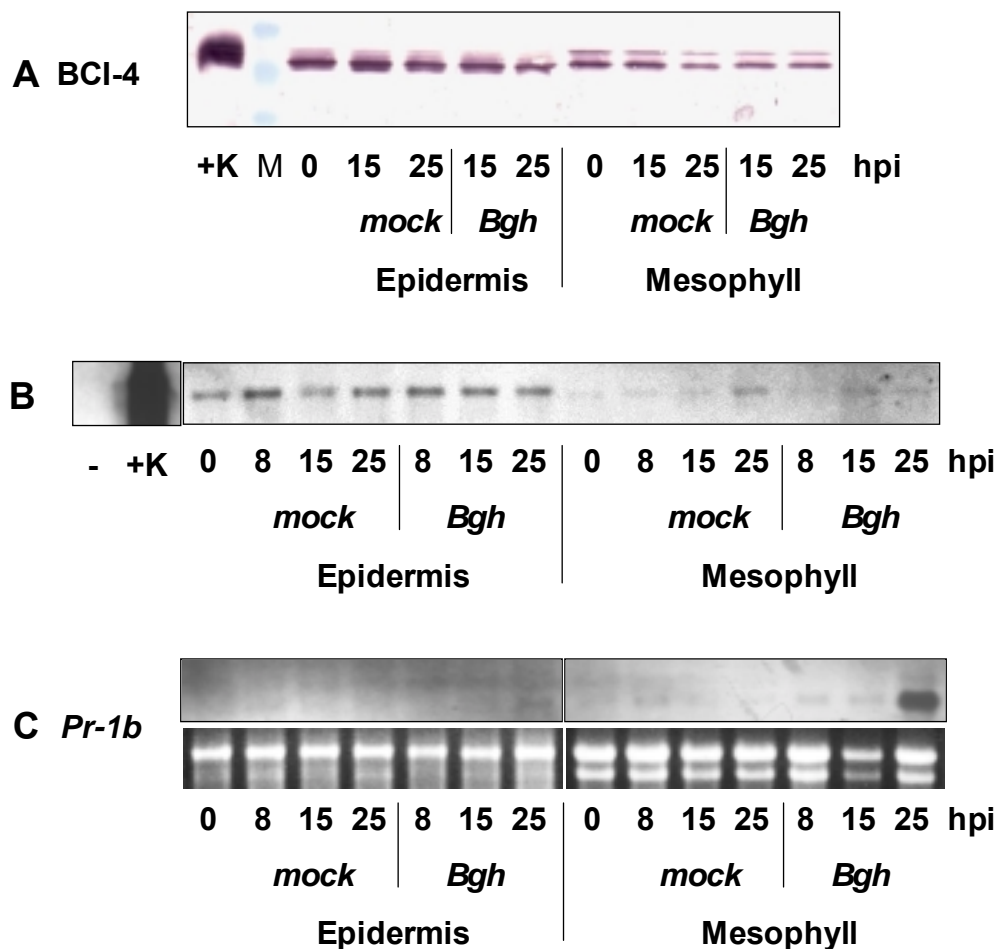


Abb. 3.22 Genexpression von *Bci-4* nach Inokulation von Gerste *BCIngrid-Mlg* mit dem Echten Mehltaupilz *BghA6*.

Acht Tage alte Gerstenpflanzen *BCIngrid-Mlg* wurden auf der abaxialen Seite ihrer Primärblätter mit *BghA6* oder *mock*-inokuliert. Nach 8, 15 und 25 hpi wurde jeweils die abaxiale Epidermis vom restlichen Blatt getrennt und RNA bzw. Protein extrahiert. **A** Nach SDS-PAGE der Proteinextrakte (20 µg Protein pro Spur) und Herstellung von *Western Blots* wurde BCI-4-Protein mit Anti-BCI-4-Antikörpern (8458) hybridisiert. Als Molekularmarker (M) wurde ein vorgefärbter Proteinstandard (9-182 kD), als positiv Kontrolle (+K) ein bereits überprüfter Proteinextrakt eines induzierten Blattes verwendet. **B** In einer RT-PCR wurde mit genspezifischen Primern von je 500 ng Gesamt-RNA *Bci-4* cDNA synthetisiert und amplifiziert (23 PCR-Zyklen). Parallel dazu wurde ein Reaktionsansatz mit RNA von induzierten Pflanzen (cv. Ingrid, 250 mg L⁻¹ BTH gegossen, 48 hpt) als positiv-Kontrolle (+K) und ein Ansatz ohne RNA als negativ-Kontrolle (-) mitgeführt. Nach gelelektrophoretischer Trennung der PCR-Produkte und Herstellung von *Blots* wurden diese mit *Bci-4*-Sonde unter stringenten Bedingungen bei 68 °C hybridisiert. **C** Nach gelelektrophoretischer Trennung von Gesamt-RNA (Epidermis: je 1 µg, Mesophyll: je 2,5 µg RNA pro Spur) und Herstellung von *Northern Blots* wurde die mRNA mit *HvPr-1b*-Sonde unter stringenten Bedingungen hybridisiert. Die gleichmäßige RNA-Beladung des Gels wurde anhand EtBr-vermittelter Fluoreszenz der ribosomalen RNA unter UV-Licht überprüft.

3.4.4 Transiente Überexpression eines Fusionsproteins von *Bci-4* und *GFP* in Epidermiszellen von Zwiebel (*Allium cepa* L.) zur subzellulären Lokalisierung

Mittels biolistischer Transformation intakter pflanzlicher Gewebe sollte durch transiente Überexpression von *Bci-4* als Fusionsprodukt mit einem Reporter die subzelluläre Lokalisierung des Proteins bestimmt werden. Als Reporter wurde das fluoreszierende Protein GFP gewählt, das bei Anregung grün autofluoresziert. Die Herstellung des Plasmides für das Fusionsprotein erfolgte über PCR-gestützte Klonierung des ORF von *Bci-4* mittels genspezifischer Primer, die an ihren Enden entsprechende Restriktionsschnittstellen enthielten. Mit Hilfe dieser wurde der ORF *in frame* vor das Reportergen kloniert. Von acht überprüften Klonen wurde das Plasmid isoliert und jeweils zwei Plasmide zusammen in Epidermiszellen geschossen.

Zum Vergleich der Lokalisierung wurden zwei zusätzliche Konstrukte eingesetzt. Das Eine enthielt die Sequenz eines cytoplasmatisch lokalisierten GFP, das Andere die Sequenz eines im Endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisierten GFP (s. 2.11.2). Alle Konstrukte standen unter Kontrolle eines konstitutiven Promoters des Blumenkohl-Mosaik-Virus (CaMV-35S). Die Plasmide wurden an *Microcarrier* (Wolframpartikel) präzipitiert und mittels Heliumdruck in Epidermiszellen von Gerstenprimärblättern cv. Ingrid, von Rosettenblättern von *Arabidopsis thaliana* (Col-0, Nottingham Arabidopsis Stock Center, Nottingham, UK; Anzucht bei 16 h Licht und 20 °C) und von *Allium cepa*-Zwiebeln geschossen, die in Petrischalen auf Phytagar ausgelegt waren. Die Expression des Fusionsproduktes wurde anhand der grünen Fluoreszenz ab 30 h nach dem Beschuss unter entsprechender Anregungswellenlänge (485 nm) ausgewertet und mit der Lokalisierung der Kontrollkonstrukte verglichen.

Die GFP-Fluoreszenz des cytoplasmatisch lokalisierten Proteins war in transformierten Epidermiszellen von Gerste, *Arabidopsis* und *Allium*-Zwiebeln nachweisbar. Das Protein, das ins ER geleitet und dort zurückgehalten wurde, fluoreszierte nur in *Arabidopsis*- und Zwiebelepidermen und das Fusionsprodukt von BCI-4 mit GFP war ausschließlich in Zwiebelepidermiszellen sichtbar. Die Aufnahmen, die mittels konfokaler Lasermikroskopie entstanden, geben einen Eindruck der beobachteten Expression in *Allium*-Epidermen wieder (Abb. 3.23). Links sind die vergleichenden Kontrollen mit cytoplasmatisch (GFP) und ER-lokalisiertem (GFP-ER [1, 2]) GFP gezeigt. Bei der Lokalisierung im Cytoplasma bleibt die Fluoreszenz auf einen Saum entlang der Zellwand mit verstärkter Akkumulation um den Zellkern herum und auf einige Plasmastränge beschränkt. Fluoresziert das ER, so ist seine netzartige Struktur und Verteilung in der kompletten Zelle sichtbar. Auf der rechten Seite der Abbildung 3.23 sind Aufnahmen von der Fluoreszenz des Fusionsproteins BCI-4:GFP zu sehen. Die oberen beiden Aufnahmen könnten eine Lokalisierung von BCI-4:GFP im Cytoplasma widerspiegeln, eine Akkumulation in Cytoplasmasträngen, sowie um den Zellkern (Abb. 3.23, BCI-4:GFP [1,

2]) ist deutlich erkennbar. Die untere Aufnahme in Abbildung 3.23 (BCI-4:GFP [3]) deutet auf eine mögliche Anreicherung von BCI-4:GFP im ER hin, da eher netzartige Strukturen, die sich durch die ganze Zelle ziehen, sichtbar sind. Eine Beschränkung der BCI-4:GFP Lokalisierung auf die Plasmamembran, den Zellern oder die Vakuole können ausgeschlossen werden.

Abb. 3.23 Subzelluläre Lokalisierung von BCI-4 als Fusionsprotein mit GFP. *Abb. s. nächste Seite.*

Epidermiszellen von *Allium cepa*-Zwiebeln wurden mit Fusionsplasmiden von *Bci-4*-ORF mit dem Reportergen *GFP* in pGY1 (pGY1-BCI-4:GFP) mittels Partikelbeschuss transient transformiert (BCI-4:GFP). Zum Vergleich der Lokalisierung wurde zusätzlich ein im Cytoplasma (GFP) und ein im Endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiertes GFP-Protein (GFP-ER) überexprimiert. Alle Genkonstrukte standen unter Kontrolle des konstitutiven CaMV-35S-Promoters. Falschfarbenaufnahmen der GFP-Fluoreszenz entstanden 2 Tage nach der Transformation durch konfokale Lasermikroskopie bei 200-facher oder 630-facher (Öl)immersion, GFP-ER [2] und BCI-4:GFP [3]) Auflösung. BCI-4:GFP [2] zeigt eine Übereinanderlagerung mehrerer gescannter Ebenen.

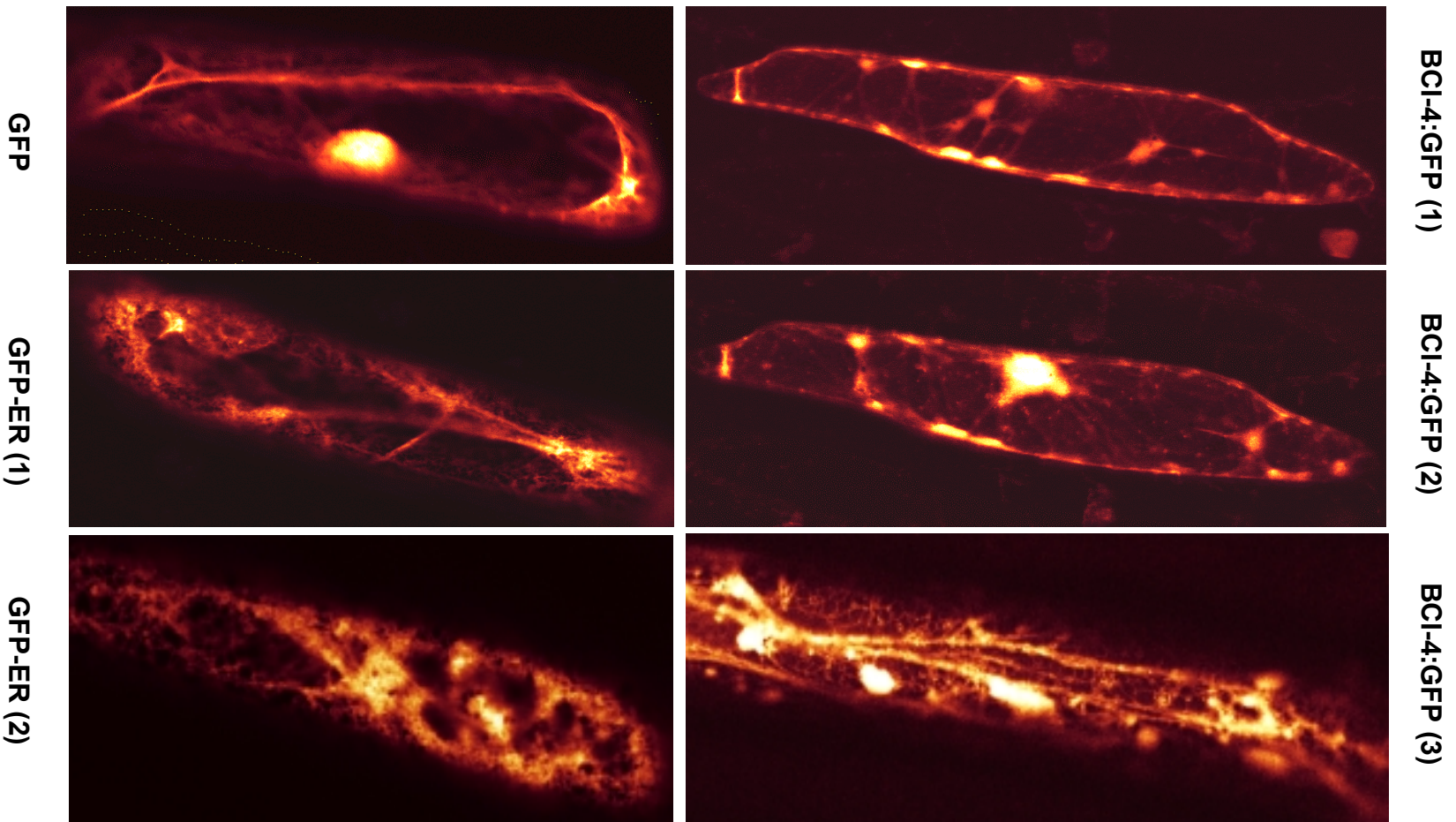


Abb. 3.23 Subzelluläre Lokalisierung von BCI-4 als Fusionsprotein mit GFP. *Legende s. vorherige Seite.*

3.4.5 Transiente Überexpression von *Bci-4* in Gerstenblättern zur Untersuchung des Einflusses auf die Interaktion mit dem Echten Mehltaupilz

In einem von Schweizer *et al.* (1999) auf der Grundlage erster transienter Expressionssysteme in Gerste (Nelson & Bushnell 1997, Shirasu *et al.* 1999) entwickelten transienten Transformationssystems zur Überprüfung einer Genfunktion im Pathosystem Gerste - Echter Gerstenmehltau wurde der Einfluss von BCI-4 auf die Interaktion mit *Bgh* untersucht. Primärblattsegmente suszeptibler Gerstenpflanzen cv. Pallas, Golden Promise und Ingrid wurden mit dem ORF von *Bci-4* und einem Reportergen (*Uida* für β -Glucuronidase [GUS] oder *GFP*, für das grün fluoreszierende Protein [GFP]) cotransformiert. Insgesamt erfolgte in je drei Versuchen eine Cotransformation durch Partikelbeschuss von *BCI-4* mit *Uida* bzw. *GFP*. Für *Bci-4* wurden Konstrukte mit ORF1 (*open reading frame* mit Startcodon) und ORF2 (*open reading frame* ohne erstes Startcodon) in pGY1 hergestellt, so dass einmal das funktionale Protein (ORF1), und einmal ein verkürztes Protein (ORF2, kein Signalpeptid, *EF-hand* Motiv direkt N-terminal) entstehen konnte. Vier Stunden nach Beschuss der Blattsegmente wurden diese mit *BghA6* dicht inokuliert und für 48 h bei RT inkubiert. Die Interaktionen der transformierten Epidermiszellen wurden bei Coexpression von *GFP* anschließend *in vivo* unter Fluoreszenzanregung mikroskopisch ausgewertet. Mit β -Glucuronidase cotransformierte Blätter wurden mit einer Substratlösung (x-gluc) inkubiert, anschließend entfärbt und danach im Durchlicht mikroskopiert. Die Experimente, in denen die Gerstensorten Pallas und Golden Promise verwendet wurden, führte Ralph Hückelhoven, IPAZ Gießen, in der Arbeitsgruppe von Robert Dudler, Uni Zürich, Schweiz, unter Anleitung von Patrick Schweizer, derzeit Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung, Gatersleben, durch.

In Abbildung 3.24 ist die mikroskopische Auswertung des Einflusses der Überexpression von *Bci-4* auf die Interaktion von Gerste mit dem Echten Mehltaupilz dargestellt. Es wurden erfolgreiche und abgestoppte Penetrationsereignisse an transformierten Epidermiszellen nach Beschuss mit *Bci-4* (plus Reporter) im Vergleich zu Beschuss des Reporterkonstruktes alleine (Kontrolle) ausgezählt. In den Photos auf der rechten Seite (Abb. 3.24 A [b, c]) ist jeweils ein erfolgreiches Penetrationsereignis abgebildet, in dem es dem Pilz gelingt, ein Haustorium in einer transformierten Epidermiszelle zu etablieren und daraufhin sekundäres Mycel (*elongating secondary hyphae*, ESH) auszubilden. Die grünblaue Färbung der transformierten Zellen erfolgte aufgrund der Umsetzung des Substrates x-gluc durch die coexprimierte β -Glucuronidase. Das Haustorium ist ebenfalls deutlich grünblau gefärbt, da es von einer extrahaustorialen Matrix umgeben ist, die aus der Plasmamembran der Wirtszelle gebildet und vom Cytoplasmasaum der Epidermiszelle, in dem der Farbstoff akkumuliert, umgeben wird. In der auf der linken Seite abgebildeten Interaktion (Abb. 3.24 A [a]) wurde das Eindringen des Pilzes durch die Bildung einer

effektiven Papille verhindert, der Penetrationsversuch wurde abgestoppt und der Pilz war nicht in der Lage, sich weiter auf der Blattoberfläche auszubreiten. Aus Abbildung 3.24 B geht hervor, dass die Überexpression von *Bci-4* die Penetrationsrate von *Bgh* reduziert. In den Versuchen mit den Gerstensorten cv. Pallas und Golden Promise (Abb. 3.24 [1] und [2]) reduzierte die Akkumulation des funktionalen Proteins BCI-4 (ORF1) bei Coexpression von β -Glucuronidase (GUS) die Anzahl der erfolgreich etablierten Haustorien durch verstärkte Abwehrreaktionen der attackierten Zellen (Papillenbildung) um ca. 50 % im Vergleich zur Kontrolle (Expression von β -Glucuronidase). In drei Experimenten mit cv. Ingrid (Abb. 3.24 [3]-[5]) wurde die Penetrationsrate durch *Bci-4* (ORF1) jeweils um ca. 20 % im Vergleich zur Kontrolle (Expression von β -Glucuronidase, GUS [3] oder grün fluoreszierendem Protein, GFP [4] und [5]) reduziert. In einem Versuch blieb der Anteil abgewehrter Pilzattacken unverändert (Abb. 3.24 [6]). Die Überexpression des um das Signalpeptid verkürzten BCI-4-Proteins (ORF2) wurde in einem Experiment mit untersucht (Abb. 3.24 [5]), hatte jedoch keinen Einfluss auf die Interaktion von Gerste cv. Ingrid mit *Bgh*.

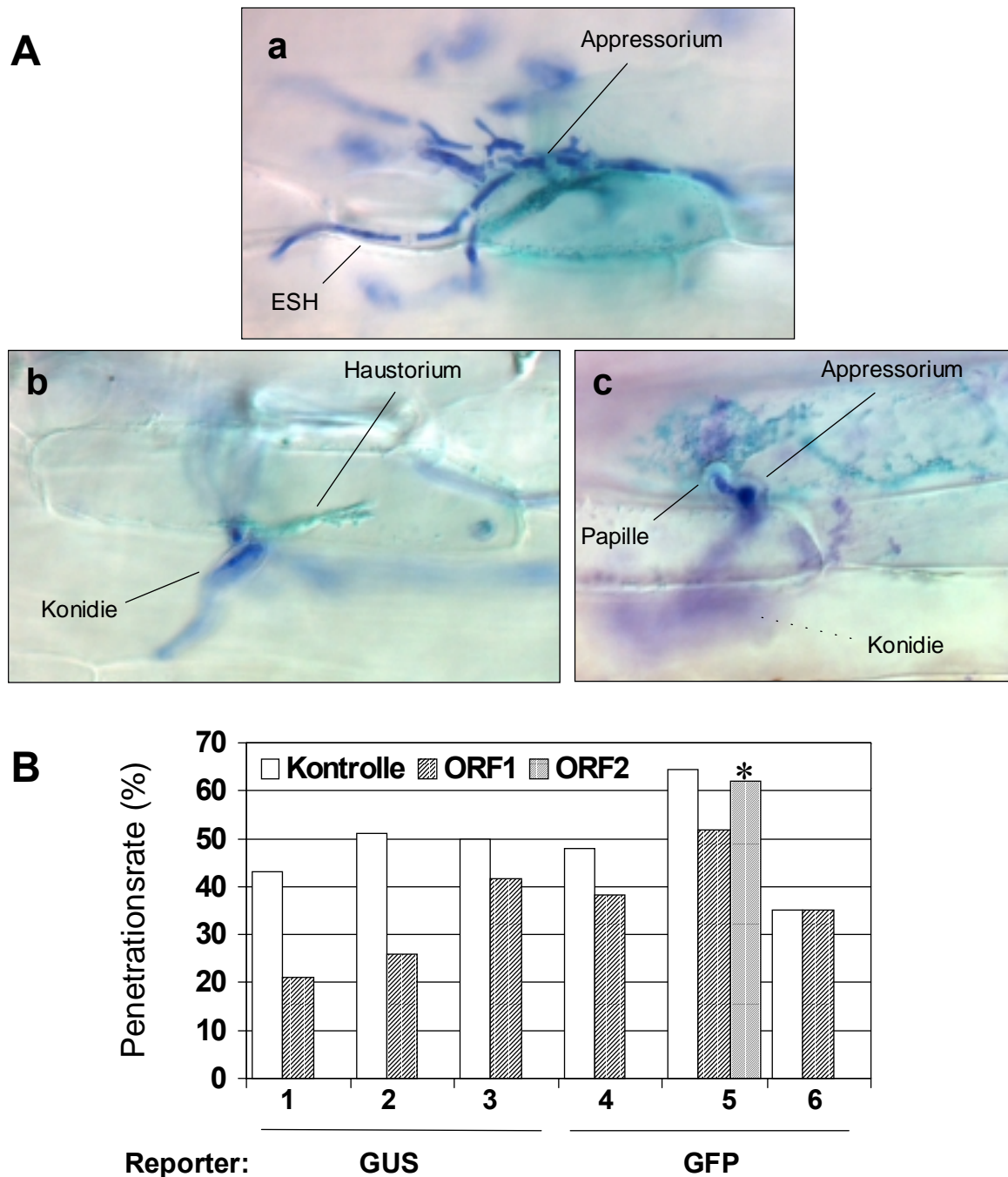


Abb. 3.24 Einfluss von *Bci-4* auf die Interaktion von Gerste mit *Bgh*.

In Primärblattsegmenten von Gerstenpflanzen cv. Pallas (1), Golden Promise (2) und Ingrid (3-6) wurde BCI-4 (ORF1) und ein am N-Terminus verkürztes BCI-4-Protein (ORF2*) jeweils mit einem Reporterprotein (β -Glucuronidase: GUS oder das grün fluoreszierende Protein: GFP), bzw. ein Reporterkonstrukt alleine als Kontrolle exprimiert. Die transiente Transformation von Epidermiszellen wurde in sechs unabhängigen Experimenten (1-6) mittels Partikelbeschuss intakter Blätter durchgeführt. Die Auswertung der Interaktionsstellen von Pilz und transformierten Zellen erfolgte 48 hpi nach Inokulation mit *BghA6* (Schweizer *et al.* 1999). Die Anzahl der Interaktionsstellen mit effektiver Papillenbildung (abgewehrter Penetrationsversuch) und mit Ausbildung eines Haustoriums bzw. Sekundärmycel (ESH) wurde im Vergleich zu Kontrolltransformationen (Expression von Reportergen alleine) ausgewertet (30-70 Interaktionsstellen pro Säule). Die Penetrationsrate gibt das Verhältnis von etablierten Haustorien zu untersuchten Interaktionsstellen in % an.

4 DISKUSSION

4.1 INDUZIERTER RESISTENZ VON GERSTE GEGENÜBER *BLUMERIA GRAMINIS* F.SP. *HORDEI*

Viele Untersuchungen belegen das Phänomen der systemisch induzierten Resistenz (sIR) in dikotylen Pflanzen gegen verschiedenste Pathogene wie Viren, Bakterien und Pilze, als auch gegen Befall mit herbivoren Insekten (Hammerschmidt 1993, van Loon *et al.* 1998). In Monokotylen und besonders in Getreide wie z.B. Gerste sind nur wenige Beobachtungen über biotisch ausgelöste, systemische Resistenzen beschrieben (Hwang & Heitefuss 1982, Sarhan *et al.* 1991). Die chemischen Resistenzinduktoren 2,6-Dichlorisonikotinsäure (DCINA) und Benzo(1,2,3)thiadiazol-7-carbothionsäure-S-methylester (BTH), die als Salicylsäure (SA)-Analoga angesehen werden und in Dikotylen den natürlichen SA-abhängigen sIR-Signalweg auslösen sollen (SAR, Ryals *et al.* 1996), sind jedoch auch in Getreide wirksam. Chemisch induzierte Resistenz (cIR) wurde in Gerste gegen *Blumeria graminis* (Kogel *et al.* 1994), in Weizen gegen *Blumeria graminis*, *Puccinia recondita* und *Septoria nodorum* (Görlach *et al.* 1996), in Reis gegen *Magnaporthe grisea* (Schweizer *et al.* 1997) und in Mais gegen *Peronosclerospora sorghi* (Morris *et al.* 1998) beschrieben. Dabei scheint im Gegensatz zu Dikotylen für den Aufbau einer Resistenz in Gerste und Reis die Akkumulation von SA keine Voraussetzung zu sein (Hückelhoven *et al.* 1999, Smith & Métraux 1991, Vallélian-Bindschedler *et al.* 1998).

4.1.1 Wirkung chemischer Resistenzinduktoren

Da die beobachtbaren Abwehrmechanismen im Pathosystem Gerste - Echter Gerstenmehltau bei der cIR ähnliche wie bei der *Mlg*-vermittelten Resistenz sind (Kogel *et al.* 1994) und durch beide Formen der Resistenz Abwehrmechanismen schneller bzw. effektiver ablaufen, wäre es denkbar, dass dabei gleiche Elemente eines Signalweges genutzt werden. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde in der vorliegenden Arbeit die Wirksamkeit chemischer Induktoren in der Gerstensorte Manchuria untersucht, die kein bekanntes Resistenzgen gegen den Echten Gerstenmehltaupilz (*Blumeria graminis* f.sp. *hordei*, *Bgh*) trägt. Die Wirkung von DCINA und BTH wurde dabei makroskopisch, die induzierten Abwehrmechanismen auf cytologischer Ebene verglichen (s. 3.1.1). Es zeigte sich, dass beide Induktoren die Resistenz gegenüber *BghA6* erhöhen konnten. Dabei schwankte die Reduktion des Befalls (Anzahl der gebildeten Mehltaupusteln) in verschiedenen Experimenten zwischen 20 und 70 % im Vergleich zur Kontrolle, in

parallelen Ansätzen mit anderen Gerstensorten zwischen 40 und 70 % (ohne Abbildung). Die mikroskopische Analyse zweier Experimente mit cv. Manchuria ergab eine Reduktion der vom Pilz erfolgreich penetrierten Zellen um ca. 40 % durch cIR unabhängig von der Applikation der unterschiedlichen Induktoren BTH oder DCINA (Abb. 3.1 A und B). Als Abwehrmechanismus überwog dabei jeweils die Bildung effektiver Papillen (Pap, 30-40 % der Interaktionsstellen) über der zusätzlich zur Papillenbildung auftretenden Hypersensitiven Reaktion (Pap+HR, 10-20 % der Interaktionsstellen). Dieses Ergebnis ist mit dem DCINA-induzierter Gerste cv. Sultan5 (Schiffer 1998) und BTH-induzierter Gerste cv. Ingrid (Jarosch *et al.* 1997) vergleichbar, wohingegen die chemisch induzierte Gerstensorte Pallas 40-60 % Papillenbildung und bis zu 30 % Papillen zusammen mit einer HR zeigen (Kogel *et al.* 1994, Hückelhoven 1999). Die Gerstenlinie Pallas scheint grundsätzlich stärker hypersensitiv auf den Pilz zu reagieren (Hückelhoven 1999). Die cIR wurde als Phänokopie der *Mlg*-vermittelten Resistenz beschrieben (Kogel *et al.* 1994), bei der ebenfalls die Abwehrmechanismen der Papillenbildung alleine und in Assoziation mit einer HR auftreten (Görg *et al.* 1993). Allerdings ist in dieser resistenzgenvermittelten Resistenz der Anteil von Papillenbildung mit zusätzlicher HR deutlich größer als der ohne (60-70 % Pap+HR im Vergleich zu 25 % Pap) und der Schutz vollständig (Görg *et al.* 1993, Hückelhoven 1999). Trotz quantitativer Unterschiede der Beteiligung von Abwehrmechanismen bei der cIR zwischen verschiedenen Gerstenlinien ist die Induzierbarkeit einer Resistenz gegenüber *Bgh* durch DCINA und BTH gleichermaßen gegeben und scheint unabhängig von der Existenz von Resistenzgenen zu sein. In Manchuria scheint DCINA das Auftreten einer HR nach effektiver Papillenbildung leicht zu fördern. Dies könnte ein physiologischer Nebeneffekt der Chemikalie sein oder Differenzen im Wirkmechanismus widerspiegeln, der im Fall von DCINA das Auslösen einer HR als Reaktion auf das Pathogen beschleunigt. Generell wird angenommen, dass DCINA und BTH beide an der gleichen Stelle wie SA oder *downstream* von SA in die SAR-Signaltransduktionskette eingreifen (Görlach *et al.* 1996, Friedrich *et al.* 1996, Lawton *et al.* 1996). Hinweise auf Variationen des Wirkmechanismus bei den Induktoren geben Untersuchungen an Wildgersten, bei denen keine Korrelation zwischen DCINA und BTH in Bezug auf die Wirksamkeit gegen *Bgh* nachgewiesen werden konnte (Ahlemeyer *et al.* 2001). Versuche mit der anfälligen Sorte Ingrid (*Mlo*, *Ror*) und der partiell anfälligen Mutante A89 (*mlo5*, *ror1-2*) belegen zusätzlich Unterschiede in der Wirksamkeit des Resistenzinduktors DCINA in diesen Linien. Die Mutante A89 ist mit DCINA deutlich stärker als cv. Ingrid induzierbar (Reduktion der Pustelzahl bis zu 80 % bzw. bis zu 60 %), während BTH in beiden Gerstenlinien gleichermaßen wirkt (bis zu 80 % Reduktion), d.h. eine generelle Induzierbarkeit in cv. Ingrid ist nicht vermindert (s. Abb. 3.3 A und B). Dieses Phänomen wurde mehrfach bestätigt, ebenso wie die vergleichsweise schwache resistenzinduzierende Wirkung von SA, dem natürlich vorkommenden Induktor der SAR in Dikotylen (Jarosch *et al.* 1997, Kogel *et al.* 1995, Schneider *et al.* 1996, Ward *et al.*

1991). SA-Applikation reduziert den Befall mit Echtem Mehltau an Gerste maximal um 20 % (s. Abb. 3.3 A und B). Interessanterweise führt die Applikation von 3,5-Dichlorsalicylsäure (DCSA) zu vergleichbarem Schutz vor *Bgh* wie DCINA, dagegen die Applikation der unchlorierten Isonikotinsäure zu keiner oder geringfügiger Resistenzinduktion (Kogel *et al.* 1995). Möglicherweise werden chlorierte Formen besser aufgenommen, transportiert oder weniger schnell z.B. durch Glycosilierung in der Pflanze inaktiviert. Die schnelle Konjugation hauptsächlich zu β -Glucosiden nach Applikation von SA führt zum Verlust der Phloemmobilität der freien Säure (Enyedi & Raskin 1993), so dass nur ein geringer Anteil der ursprünglich applizierten Menge in unbehandelten Blättern nachweisbar ist (Metraux *et al.* 1990). Die Induktion einer UDP-Glucose:SA-*O*-Glucosyltransferase-Aktivität und die Akkumulation des SA-Glucosids nach SA-Applikation wurde in Gerste nachgewiesen (Biermann & Kogel, unveröffentlicht). Die Verwendung höherer Dosen als die Eingesetzten führt jedoch schnell zu starker Phytotoxizität (s. auch Kessmann *et al.* 1994). In den resistenzgenbedingten Resistenzen von Gerste gegen *Bgh* bzw. in kompatiblen Interaktionen ist keine SA-Akkumulation nachweisbar und damit anscheinend generell keine Voraussetzung für die Abwehr oder Bestandteil der Pathogenese (Hückelhoven *et al.* 1999, Vallelían-Bindschedler *et al.* 1998).

4.1.2 Wirkung von Phytohormonen und Wundverletzung

Kogel *et al.* (1995) konnten zeigen, dass auch das Phytohormon Jasmonsäure (JA) bzw. Methyljasmonat (JM) in Gerste nicht zur Resistenz gegenüber Echtem Mehltaupilz führt und nicht bei der resistenzgenvermittelten Ausprägung der Resistenz akkumuliert. In anderen Pathosystemen mit Dikotylen wurde eine Beteiligung von JA/JM an der Signaltransduktion verschiedener Resistenzreaktionen nachgewiesen (Maleck & Dietrich 1999, Pieterse & van Loon 1999, Thomma *et al.* 2001).

Das Phytohormon Abscisinsäure (ABA), das vorwiegend hemmende Wirkungen in Pflanzen ausübt (Hemmung der Photosynthese, der Zellstreckung und -teilung, Stomataschluss) und daher auch als Stresshormon bezeichnet wird, kann die Salz- und Trockenstresstoleranz, sowie Frostresistenz erhöhen (Hock & Elstner 1995). Eine Rolle von ABA bei der Wundresistenz wird diskutiert, konnte bei der induzierten Pathogenresistenz jedoch bislang nicht nachgewiesen werden (Hammerschmidt 1993). Auf die Interaktion von Gerste mit *Bgh* hatte die Applikation von ABA keinen Einfluss (s. 3.1.2.3).

In Reis wie in verschiedenen Dikotylen wurde eine Resistenzinduktion durch Verwundung oder Insektenfraß beschrieben, hauptsächlich gegenüber Insekten, teilweise aber auch gegenüber Pathogenen (Bostock 1999, Hammerschmidt 1993, Schweizer *et al.* 1998). In Gerste konnte weder durch Perforation der Primärblätter als Wundreiz (s. 3.1.2.4), noch durch den Befall mit der Großen Getreideblattlaus *Sitobion avenae* (nicht gezeigt)

Resistenz gegenüber dem Echten Gerstenmehltaupilz hervorgerufen werden. Sieben Tage nach Aufsetzen der Läuse, in denen sich ihre Zahl vervierfacht hatte, erfolgte die Inokulation mit *Bgh*. Kontrollpflanzen ohne Blattlausbefall erschienen grüner, und hatten geringfügig weniger, dafür aber größere Pusteln. Die Schwächung der Pflanze aufgrund des Nährstoffentzuges durch den Befall mit Blattläusen führte dabei möglicherweise zu einer leicht erhöhten Anfälligkeit gegenüber *Bgh*, während die eingeschränkte Nährstoffversorgung anschließend das reduzierte Wachstum des biotrophen Pilzes bewirkte.

4.1.3 Einfluss biotischer Faktoren auf die Resistenz

4.1.3.1 Wirkung von *Blumeria graminis* f.sp. *tritici*

Echter Weizenmehltau (*Blumeria graminis* f.sp. *tritici*, *Bgt*) gilt auf Gerste als Nicht-Wirt-Pathogen und wurde mehrfach als biotischer Induktor einer lokalen Resistenz gegenüber *Bgh* beschrieben (Ouchi *et al.* 1974, 1976, Schweizer *et al.* 1996, Tosa & Shishiyama 1984). Dieser Effekt konnte in Gerste cv. Manchuria nicht bestätigt werden (s. 3.1.2.1). Eine Präinokulation mit *Bgt* führte sogar zu erhöhtem Auftreten von Pusteln unabhängig von einer ein- oder viertägigen Induktionsphase (s. Abb. 3.2 A) und zu erhöhter Anzahl von Interaktionsstellen mit etabliertem Haustorium und Sekundärhyphen (s. Abb. 3.2 B). Eine *Bgt*-Inokulation ohne nachfolgende *challenge*-Inokulation führte dagegen nicht zur Bildung makroskopisch sichtbarer Pusteln. Dieses Phänomen könnte durch die Kombination zweier Reaktionen hervorgerufen werden. Einerseits wurde von Tosa & Shishiyama (1984) beschrieben, dass in verschiedenen Genotypen der Gerste unterschiedliche Mechanismen zur Abwehr des Nicht-Wirt-Pathogens *Bgt* beitragen und der Pilz z.B. nach Penetration und Ausbildung eines Haustoriums erst 7 dpi durch eine HR gestoppt wurde oder sogar Konidien bilden konnte. Damit ist die Resistenz von Gerste gegenüber unpassenden *formae speciales* von *Blumeria graminis* wie z.B. *tritici* nicht vollständig ("near non-host"). Andererseits gibt es seit langem die Beobachtung einer sogenannten induzierten Zugänglichkeit (Carver *et al.* 1999, Komura *et al.* 1990, Ouchi *et al.* 1974). Darunter versteht man den Effekt, dass normalerweise avirulente Pathogene durch die Präinokulation mit einem virulenten Pathogen ebenfalls Wirtszellen besiedeln können. Im vorliegenden Fall wurde makroskopisch keine Sporulation nach *Bgt*-Inokulation festgestellt, die Abwehr könnte jedoch verzögert gewesen sein, so dass es zur Ausbildung von Haustorien kommen konnte, das weitere Wachstum jedoch durch eine spätere HR verhindert wurde. Abgestorbene Zellen waren auf dem mit *Bgt* inokuliertem Blatt 7 dpi makroskopisch sichtbar, die Existenz eines Haustoriums jedoch nicht zu beurteilen. Die nachfolgende Inokulation mit dem virulenten Pathogen *Bgh* erfolgte nach ein bis vier Tagen möglicherweise früh genug, um die späte HR von *Bgt*-penetrierten

Zellen zu verhindern und damit in Einzelzellkompatibilität zu verkehren. Als Resultat dieser Reaktionen könnte schließlich die vermehrte Pustelbildung bzw. die erhöhte Anzahl Interaktionsstellen mit Sekundärhyphen zu beobachten gewesen sein. Detaillierte mikroskopische Analysen zu späteren Zeitpunkten nach der Inokulation mit *Bgt* müssten für die Bestätigung dieser Hypothese durchgeführt werden. Erst danach bliebe zu überprüfen, inwieweit dieser bislang spekulative Effekt auf die sehr anfällige Sorte Manchuria beschränkt ist.

4.1.3.2 Wirkung phytopathogener Bakterien

Nach Infiltration verschiedener Nicht-Wirt-Bakterien in Primär- und Sekundärblätter von Gerste konnte lokale und systemische Resistenz gegenüber *Bgh* beobachtet werden. Dieser Effekt war jedoch nicht verlässlich reproduzierbar und nicht mit SA-Akkumulation, Nekrosenbildung oder einem bestimmten Bakterienstamm korrelierbar (Stein, unveröffentlicht). Als Bakterien wurden phytopathogene Pseudomonaden (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, *P.s.* pv. *syringae* Pss61, *P.s.* pv. *glycinea* PG4180) und *Bacillus subtilis* eingesetzt. Im Kulturmedium war keine SA-Bildung durch die Bakterien zu beobachten, ebenso wenig wie nach Infiltration von Gerstenblättern mit abgetöteten Bakterien. Die Infiltration lebender Pseudomonaden führte zur SA-Akkumulation im infiltrierten Blattbereich, nicht jedoch in der Blattspitze, in der Blattbasis oder in nicht-infiltrierten systemischen Blättern (Abb. 4.1). Dabei rief die Infiltration vom DC3000 die stärkste SA-Akkumulation hervor, gefolgt von Chlorosenbildung und anschließender starker Nekrotisierung des Infiltrationsbereiches. In mit Pss61 oder PG4180 infiltrierten Blättern akkumulierte später und weniger SA, wobei es bei Pss61 ebenfalls zu Nekrosenbildung kam, bei PG4180 dagegen nur zur Bildung einer Chlorose. Durch *Bacillus subtilis* kam es weder zur SA-Akkumulation noch zur Chlorosen- oder Nekrosenbildung, aber dennoch auch zur Resistenzinduktion gegenüber *Bgh* (Abb. 4.1). Das bedeutet, dass eine mögliche Resistenzinduktion durch die Reaktion mit Nicht-Wirt-Bakterien nicht von einer SA-Akkumulation abhängig ist, diese jedoch mit der Stärke einer nachfolgenden Nekrosenbildung korreliert (vgl. auch Vallélian-Bindschedler *et al.* 1998).

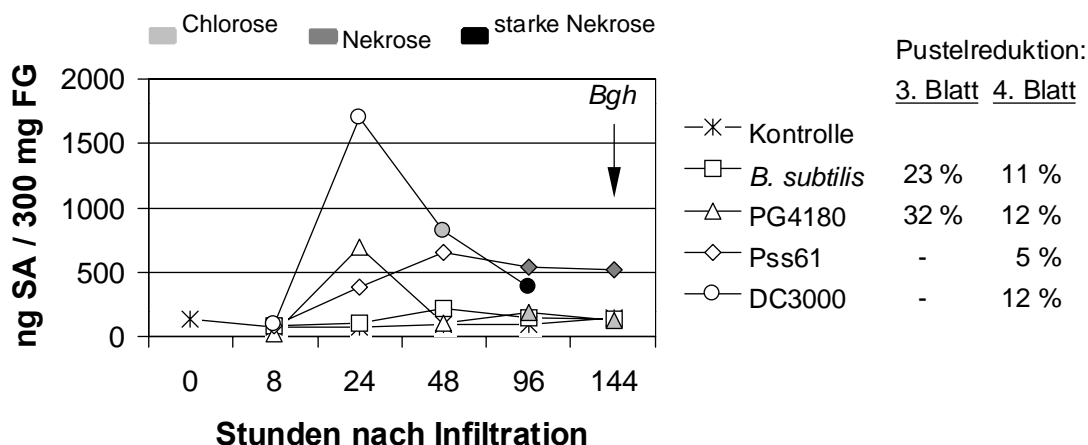


Abb. 4.1 SA-Akkumulation, Nekrosenbildung und Resistenzinduktion gegenüber *Bgh* durch Infiltration von Nicht-Wirt-Bakterien.

Primär- und Sekundärblätter vierzehn Tage alter Gerstenkeimlinge (cv. Ingrid) wurden mit Suspensionen von *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (DC3000), *P.s.* pv. *syringae* (Pss61), *P.s.* pv. *glycinea* (PG4180), *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) jeweils in 5 mM MgSO₄, bzw. mit 5 mM MgSO₄ (Kontrolle) infiltriert. Die Blattproben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet, das Ausmaß der Chlorosen- oder Nekrosenbildung bonitiert und der SA-Gehalt im infiltrierten Blattbereich bestimmt (nach Hückelhoven *et al.* 1999). Zum Zeitpunkt 144 h nach der Infiltration wurden Segmente der infiltrierten (1. und 2. Blatt) und nicht-infiltrierten systemischen (3. und 4.) Blätter mit *BghA6* inokuliert und die Befallsstärke (Anzahl von Pusteln cm⁻²) mit Kontrollen verglichen (Pustelreduktion in % der Kontrolle). FG Frischgewicht

4.1.4 Bewertung der Resistenzinduktion in Gerste gegenüber *Bgh*

Die diskutierten Ergebnisse belegen die Wirksamkeit der cIR gegenüber *Bgh* bei Verwendung SA-analoger chemischer Induktoren. Eine generelle Korrelation von SA mit Resistenzreaktionen in Gerste ist jedoch nicht gegeben, da in der konstitutiven Resistenz gegenüber *Blumeria graminis* (*Bgh* und *Bgt*) und in der Nicht-Wirt-Resistenz gegen *Bacillus subtilis* keine SA akkumuliert, obwohl dies grundsätzlich möglich ist, wie die Infiltration von Blättern mit Pseudomonaden zeigt (Hückelhoven *et al.* 1999, Vallélian-Bindschedler *et al.* 1998, Stein, unveröffentlicht).

Die Ausprägung der cIR scheint in Gerste unabhängig vom genetischen Hintergrund und der Funktionalität von Resistenzgenen möglich zu sein, wobei quantitative Unterschiede durch den genetischen Hintergrund und den Induktor bedingt sein können. In vorangegangenen Arbeiten wurde bereits gezeigt, dass gegenüber *Bgh* chemisch Resistenz induziert werden kann, auch wenn die Gerstenlinien nicht-funktionale Signaltransduktionselemente besitzen, die für die resistenzgenvermittelte Resistenz benötigt werden (*Rar1*, *Rar2*, *Ror1*; Schiffer 1998, Jarosch, Dissertation in Vorbereitung, Langen *et al.*, in Vorbereitung). Die cIR der Gerstenlinie Manchuria, die kein bekanntes Resistenzgen besitzt, wurde in dieser Arbeit gezeigt. Allerdings war eine biotische

Induktion von Resistenzreaktionen mit dem avirulenten Echten Weizenmehltaupilz in Manchuria nicht möglich.

4.2 IDENTIFIZIERUNG CHEMISCH INDUZIERTER GENE DER GERSTE

Das Phänomen der IR ist in Monokotylen weit weniger gut charakterisiert als in Dikotylen, da bislang weder die Signalmoleküle noch an der Signaltransduktion beteiligte Genprodukte beschrieben wurden. Der differentielle Ansatz mit DCINA-induzierten Gerstenpflanzen (s. 3.2) sollte zur Identifizierung von Genen führen, deren Expression am Aufbau der Resistenz beteiligt ist, um eine Charakterisierung des cIR-Mechanismus auf molekularer Ebene zu ermöglichen.

Aus einer subtrahierten cDNA-Bank aus DCINA-induzierten Gerstenblättern wurden nach *Reversed Northern*-Analysen und Sequenzierung der Basenabfolge 21 Fragmente potentiell differentiell exprimierter Gene identifiziert (s. 3.2). Nach Bestätigung der differentiellen Genexpression wurden elf dieser Gene (s. Tab. 3.2) detaillierter untersucht, um mögliche Regulationsmuster zu beschreiben. Nach ersten Untersuchungen wurden neun Gene als *Bci*-Gene beschrieben (*Bci* für *barley chemically induced*, s. Abb. 3.5), von denen *Bci-1*, *Bci-3* und *Bci-4* jeweils mehrfach identifiziert wurden, was möglicherweise auf eine starke Akkumulation der Transkripte in chemisch induzierten Gerstenblättern hinweist. Drei Gene repräsentieren identische oder homologe Sequenzen bereits bekannter Gerstenproteine: Klon 1-62 (*Hv14-3-3A*) codiert für ein 14-3-3-Protein (Brandt *et al.* 1992a), *Bci-1* (*Lox2:Hv:1*) codiert für eine Lipoxygenase (Vörös *et al.* 1998) und *Bci-2* (*THN5_HORVU*) für ein blattspezifisches Thionin (Gausling 1987). Die Lipoxygenase (*Bci-1*) und Vertreter der Thioningenfamilie (*Bci-2*) waren bereits als DCINA-induzierbar bekannt (Hause *et al.* 1999b, Kogel *et al.* 1995). Homologe zu typischen SA-abhängigen SAR-Markergenen der Dikotylen (*Pr-1*, *Pr-2*, *Pr-5*) oder zu Genen oder Genprodukten, die in chemisch induzierten Reis- oder Weizenpflanzen aktiviert werden (Görlach *et al.* 1996, Schweizer *et al.* 1997, Uknes *et al.* 1992, Ward *et al.* 1991), wurden nicht identifiziert. Im folgenden werden die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen der identifizierten Gerstengene im einzelnen betrachtet.

4.2.1 14-3-3-Protein (Klon 1-62)

In Pflanzen wie in Tieren existieren meist mehrere Isoformen des 14-3-3-Proteins, die an der Regulation verschiedenster Prozesse beteiligt sind (Finnie *et al.* 1999). Die Bindung der 14-3-3-Proteine an bestimmte Motive von Interaktionspartnern kann sowohl zu deren Aktivierung als auch zu deren Inaktivierung führen, oder eine Interaktion zwischen zwei gebundenen Proteinen ermöglichen. Für 14-3-3-Proteine in Pflanzen wurde die

Aktivierung der plasmamembranständigen H^+ -ATPase (Oecking & Hagemann 1999), einer Ca^{2+} -abhängigen Proteinkinase (CDK-1, Camoni *et al.* 1998), die Inaktivierung der Nitratreduktase (Finnie *et al.* 1999), eine Beteiligung an Proteinimport (May & Soll 2000) sowie die Bindung von Transkriptionsfaktoren (Schultz *et al.* 1998) beschrieben. Neben der Regulation des Primärstoffwechsels gibt es Hinweise für eine Beteiligung von 14-3-3-Proteinen an Stressreaktionen und Wirt-Pathogen-Interaktionen (Finnie *et al.* 1999, Roberts & Bowles 1999). Die geringfügige Transkriptakkumulation eines 14-3-3-Proteins der Gerste wurde nach Inokulation mit dem Echten Mehltaupilz (*Bgh*) in kompatiblen und inkompatiblen Interaktionen nachgewiesen (Brandt *et al.* 1992a, Gregersen *et al.* 1997). Zhou *et al.* (2000) postuliert ein Modell für die Interaktion von Gerste mit *Bgh*, in dem nach Penetration der Zelle durch *Bgh* möglicherweise ein 14-3-3-Protein eine H^+ -ATPase aktiviert, es zur Ansäuerung des Apoplasten kommt und dadurch schließlich eine epidermale HR an der Interaktionsstelle auslöst wird, die zur Abwehr des Pilzes führt. In Tomate wurde die Transkriptakkumulation verschiedener 14-3-3-Isoformen durch einen rassenspezifischen Elicitor induziert (Roberts & Bowles 1999) und in Soja akkumulierte ein 14-3-3-Transkript während der HR in einer rassenspezifischen Interaktion (Seehaus & Tenhaken 1998).

Die in dieser Arbeit identifizierte 14-3-3-Sequenz (Klon 1-62) ist höchstwahrscheinlich identisch mit dem Gerstengen *Hv14-3-3A* (Brandt *et al.* 1992a). In den Genexpressionsstudien konnte eine differentielle Regulation durch die chemischen Induktoren DCINA und BTH nicht eindeutig gezeigt werden (Abb. 3.4, 8.4 und 8.6). Die Applikation von JM hatte keinen Einfluss auf die Expression von 14-3-3 (s. Abb. 3.8). Entgegen den Ergebnissen von Brandt *et al.* (1992a) und Gregersen *et al.* (1997) war keine Transkriptakkumulation in der kompatiblen Interaktion von Gerste mit *Bgh* detektierbar, was möglicherweise auf der geringeren Inokulationsdichte, anderen Erntezeitpunkten bzw. unterschiedlichen Anzuchtbedingungen und der Verwendung einer anderen Gerstensorte beruhte (s. Abb. 3.12). Eine deutliche Geninduktion war dagegen durch die Inokulation DCINA-induzierter Blätter nachweisbar, was auf einen *priming*-Effekt hindeutet (s. Abb. 3.12). Die Pflanze wurde durch DCINA in die Lage versetzt, bei der Interaktion mit dem Pathogen das 14-3-3-Protein stärker zu akkumulieren und damit eine effektivere Abwehr auszulösen, falls das 14-3-3-Protein tatsächlich an Abwehrprozessen beteiligt ist. Allerdings wurde der Anstieg des Transkripts erst 57 hpi detektiert, wohingegen die Abwehr von *Bgh* bei der cIR früher erfolgt (12-18 hpi, effektive Papillenbildung) und somit eine regulatorische Funktion unwahrscheinlich ist. Eine Beteiligung von 14-3-3 an der HR, die ab 24 hpi nach erfolgreicher Papillenbildung auftritt, wäre denkbar, wenn die Expression um 24 hpi und nicht erst 57 hpi induziert wurde (keine Zeitpunkte zwischen 24 und 57 hpi untersucht). Der Befall von Gerste mit *Rhynchosporium secalis* führte ebenfalls zu keiner erhöhten Genexpression (s. 3.3.4.3), es wurde allerdings nur ein Zeitpunkt einer weit fortgeschrittenen Interaktion (Auftreten von makroskopisch sichtbaren Läsionen)

untersucht. Bei regulatorischen Proteinen ist jedoch eine frühe Geninduktion zu erwarten. Die Bedeutung von 14-3-3-Proteinen bei der Abwehr von Pathogenen und mögliche Kombinationseffekte mit chemischen Induktoren kann für Gerste nicht abschließend beurteilt werden.

4.2.2 Annexin-ähnliches Protein (3-16)

Pflanzliche Annexine binden, ähnlich wie tierische, Ca^{2+} -abhängig Phospholipide, wobei verschiedene Proteine dieser Multigenfamilie in unterschiedlichen Geweben vorkommen und in verschiedenste zelluläre Prozesse involviert sind. So kommen sie besonders häufig in Wurzeln, Früchten und wachsendem Gewebe vor und können an sekretorischen Prozessen, Signaltransduktion und Regulation der Callosesynthaseaktivität beteiligt sein, Aktin binden und Nukleotid Phosphataseaktivität zeigen (Breton *et al.* 2000, Kovács *et al.* 1998, Lim *et al.* 1998). Es wird eine Funktion bei Abwehrreaktionen gegenüber oxidativem Stress (Peroxidaseaktivität), osmotischem oder Trockenstress, dem Aufbau der Zellwand, sowie bei der Interaktion von *Medicago* mit Rhizobien diskutiert (de Carvalho Niebel *et al.* 1998, Giderol *et al.* 1996, Kovács *et al.* 1998, Proust *et al.* 1999).

Das isolierte cDNA-Fragment 3-16 besitzt eine Homologie zu dem Annexin von *Medicago sativa* (*AnnMs*), dessen Genexpression durch osmotischen Stress, Trockenheit und ABA-Applikation induziert werden kann und in Blüten und Wurzeln lokalisiert ist (Kovács *et al.* 1998). In Gerste wurde eine differentielle Expression durch chemische Resistenz-induktoren nur bei Verwendung von DCINA (Repression) detektiert, nicht jedoch nach BTH- oder SA-Applikation (s. Abb. 8.4 und 8.6). Durch das Phytohormon JM wurde die Expression leicht reprimiert (s. Abb. 3.8), Ethylen hatte keinen Einfluss, ebenso wie die Inokulation mit Echtem Gerstenmehltaupilz (nicht gezeigt). Nach Befall mit den nekrotrophen Pathogenen *Rhynchosporium secalis* und *Cochliobolus sativus* wurde eine leichte Repression bzw. Induktion festgestellt (s. Abb. 3.13, Abb. 8.9 B). Diese Ergebnisse wurden jedoch nicht reproduziert und sind durch die verschiedenen Funktionen, die Annexine übernehmen können, ohne weitere Untersuchungen schwer zu interpretieren. In dem Pathosystem Gerste-*Bgh* und bei der cIR scheint das Annexin jedoch keine entscheidende Rolle zu spielen.

4.2.3 BCI-1: Lipoxygenase

Lipoxygenasen (LOX, *linoleat:oxygen oxidoreductase*, EC 1.13.11.12) katalysieren die Peroxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren, in höheren Pflanzen hauptsächlich Linolsäure und Linolensäure (C_{18}), und sind damit Schlüsselenzyme der Oxylipinsignalwege, die durch verschiedene enzymatische Reaktionen von den Lipoxygenaseprodukten ausgehen (Hildebrand 1989, Weichert *et al.* 1999). Produkte der

verschiedenen Zweige sind u.a. flüchtige Aldehyde, Alkohole, Traumatin/Traumatinsäure, Ketole und Jasmonsäure, die eine Bedeutung als aromatische Komponenten, als Wachstumsregulatoren, bei Wundreaktionen, Insektenresistenz und in Wirt-Pathogen-Interaktionen besitzen können (Hildebrand 1989, Rosahl 1996, Weichert *et al.* 1999). In Reaktion auf mechanische Verletzung oder Insektenfraß entstehen die Phytohormone Traumatin und JA als Signalkomponenten der Wundheilung bzw. Abwehr, die z.B. Zellproliferation an der Wundstelle (English *et al.* 1939) oder die Synthese von Proteinaseinhibitoren (Farmer & Ryan 1992, Cordero *et al.* 1994) und RIPs (ribosomeninaktivierendes Proteins, Chaudhry *et al.* 1994, Song *et al.* 2000) induzieren (Rosahl 1996). In verschiedenen Pathosystemen ist eine Induktion der Genexpression und/oder der Aktivität von Lipoxygenasen in inkompatiblen Interaktionen beschrieben (Rosahl 1996). Ausschalten der LOX-Expression führt zur Kompatibilität bzw. zu erhöhter Anfälligkeit (Rancé *et al.* 1998). Über eine Beteiligung der Lipoxygenasen an der Entstehung von Membranschäden und dem *oxidative burst* während der HR nach Pathogenbefall wird spekuliert, da die Peroxidation von Membranlipiden zu Veränderungen der Membranen führen und dabei zusätzlich ROIs gebildet werden können (Rosahl 1996). Zudem wurde für einige Intermediate der Oxylipinsignalwege neben Signalfunktionen (JA) eine direkte antimikrobielle Wirkung nachgewiesen (z.B. von Hydroperoxyfettsäuren, flüchtigem Hexenal und Hexenol; Rosahl 1996). Auch nach chemischer Resistenzinduktion wurde eine erhöhte Transkriptakkumulation und/oder Aktivität von Lipoxygenasen nachgewiesen (Feussner *et al.* 1997, Görlach *et al.* 1996, Hause *et al.* 1999b, Schaffrath *et al.* 2000, Schweizer *et al.* 1997).

Die in Gerste während der cIR differentiell exprimierte Lipoxygenase (*Bci-1*, *Lox2:Hv:1*) wurde zuerst als methyljasmonatinduziertes Protein in Gerstenblättern identifiziert und als Linoleat 13-LOX und Arachidonat 15-LOX beschrieben (Feussner *et al.* 1995, Vörös *et al.* 1998). Die Induzierbarkeit durch chemische Resistenzinduktoren (DCINA, BTH, SA, s. Abb. 3.4 [Klon 4-56], 3.5, 3.6, 3.7) wurde bereits gezeigt und dem Fehlen einer Induktion durch Befall mit dem Echten Gerstenmehltaupilz in kompatiblen und inkompatiblen Interaktionen gegenüber gestellt (Hause *et al.* 1999b, Schiffer 1998). Die Genexpression von *Bci-1* war auf das Mesophyll beschränkt (s. Abb. 3.6) und korreliert so mit der Annahme einer chloroplastidären Lokalisation der LOX (Vörös *et al.* 1998). Die Tatsache, dass ein erhöhter endogener JA-Gehalt durch 'Floaten' auf Sorbit nicht von einer Transkriptakkumulation der LOX begleitet wird (Vörös *et al.* 1998) und bei chemischer Resistenzinduktion der endogene JA-Gehalt nicht verändert wird (Kogel *et al.* 1995), obwohl *Lox2:Hv:1* akkumuliert, deutet darauf hin, dass BCI-1 nicht an der Biosynthese von JA beteiligt ist. Dennoch kommt es bei Applikation von JM zu einer Transkriptakkumulation von *Lox2:Hv:1* (s. 3.3.2.1, Abb. 3.8; Hause *et al.* 1999b, Vörös *et al.* 1998). Unterschiede in der Induzierbarkeit von Genen durch exogenes und endogenes JA wurden mehrfach beschrieben (Löbler & Lee 1998, Vörös *et al.* 1998) und könnten auf

eine unterschiedliche Verfügbarkeit in der Zelle oder im Gewebe, auf zusätzlich induzierte inhibierende Signale oder das Fehlen zusätzlicher fördernder Signale zurückgeführt werden. Möglicherweise spiegeln sie auch den durch die artifizielle JA-Applikation verursachten Stress wider, der zu seneszenzähnlichen Reaktionen wie Chlorophyllabbau und Repression der RubisCo-Expression führen kann (Wasternack 1994). Auch die Existenz verschiedener Rezeptoren für die Perzeption von exogenem und endogenem JA wurde postuliert (Löbner & Lee 1998). Dabei soll die Perzeption des exogenen JA durch einen membranständigen und die des endogenen JA durch einen intrazellulären Rezeptor mit der Aktivierung unterschiedlicher Signaltransduktionskaskaden verbunden sein. Durch Applikation des Phytohormons Ethylen wurde eine leichte Induktion der Genexpression festgestellt (s. Abb. 3.10), Abscisinsäure (s. 3.3.2.4, Vörös *et al.* 1998) und Verwundung (s. 3.3.3) hatten dagegen keinen Einfluss. In der Pathogenese oder bei resistenzgenbedingten Resistenzreaktionen in der Interaktion von Gerste mit *Bgt* scheint *Bci-1* keine Rolle zu spielen (Schiffer 1998), ebenso wenig wie in der Nicht-Wirt-Resistenz gegenüber *Bgt* (s. 3.3.4.4) oder nach Befall mit *Cochliobolus sativus* (s. 3.3.4.2). In der Nicht-Wirt-Reaktion mit dem Bakterium *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (DC3000) wurde dagegen *Bci-1*-Transkript hauptsächlich oberhalb des infiltrierten Blattbereiches detektiert, in dem keine SA-Akkumulation nachgewiesen wurde (s. Abb. 3.14; 4.1). Außerdem akkumulierte *Bci-1*-Transkript in der Interaktion mit Blattläusen (*Sitobion avenae*, s. Abb. 3.15). Die Expression von *Bci-1* korreliert einerseits mit der frühen Induktion bei der cIR und nach Infiltration mit DC3000, die auf eine Rolle bei der Signalweiterleitung oder Bereitstellung von Abwehrstoffen hindeuten könnte. Andererseits korrelierte die Induktion möglicherweise mit Seneszenzerscheinungen, die durch exogenes JA, Ethylen und saugende Insekten entstehen können. Vörös *et al.* (1998) spekulieren ebenfalls über eine Beteiligung der LOX am Abbau chloroplastidärer Membranen während der Seneszenz, die bei JA-Applikation beobachtet wird. In Weizenblättern konnte ein *Bci-1*-Homolog detektiert werden, das bei der cIR stark, nach Befall mit einem virulentem *Bgt*-Isolat dagegen nur sehr schwach akkumuliert (Beckhove, Dissertation in Vorbereitung), und damit vergleichbar zur Situation in Gerste ist. Für eine weitere LOX aus Weizen (WCI-2, Görlach *et al.* 1996), eine LOX aus Reis (RCI-1, Schaffrath *et al.* 2000) und eine LOX aus Gurke (LOX-95, Feussner *et al.* 1997) wurde jeweils Transkriptakkumulation nach Applikation chemischer Resistenzinduktoren, nicht jedoch in Wirt-Pathogen-Interaktionen nachgewiesen, was auf die Existenz zwei getrennter Signalwege hindeutet. Da Lipoxygenasen von einer Multigenfamilie kodiert werden, können verschiedene Isoformen bei gleicher biochemischer Funktion unterschiedlich lokalisiert oder reguliert sein und somit verschiedenen Signalwegen angehören (Rosahl 1986, Schaffrath *et al.* 2000).

4.2.4 BCI-2: Thionin

Thionine sind niedermolekulare (ca. 45 aa) basische cysteinreiche Proteine einer Multigenfamilie, die toxisch auf phytopathogene Bakterien und Pilze wirken (Carmona *et al.* 1993, Epple *et al.* 1997, Gausing 1987). Sie kommen in Speichergeweben (Endosperm) und in Blättern intrazellulär hauptsächlich in der Vakuole und zellwandgebunden vor (Bohlmann *et al.* 1988, Gausing 1987, Reimann-Philipp *et al.* 1989). Ihre Expression kann durch Pathogene, Verwundung und Jasmonat induziert werden (Andresen *et al.* 1992, Bohlmann *et al.* 1998, Vignutelli *et al.* 1998). Im Pathosystem Gerste - Echter Gerstenmehltau wurde die pathogeninduzierte Genexpression eines zellwandgebundenen Thionins mit Resistenz korreliert, da in Zellwänden und Papillen an Interaktionsstellen inkompatibler Beziehungen im Vergleich zu kompatiblen eine verstärkte Akkumulation nachweisbar war (Bohlmann *et al.* 1988, Ebrahim-Nesbat *et al.* 1989, 1993).

Das in dem differentiellen Ansatz identifizierte Thionin (*Bci-2*) besitzt die größte Sequenzübereinstimmung mit einem in Gerste stark in jungen Blättern akkumulierendem Protein (Gausing 1987). Die Induzierbarkeit eines als jasmonatinduziertes lösliches Protein identifizierten Thionins (*Jip-6*, Andresen *et al.* 1992) durch die chemischen Resistenzinduktoren DCSA und DCINA wurde von Kogel *et al.* (1995) gezeigt. Entsprechend wurde die Expression von *Bci-2* sowohl durch die Induktoren DCINA und BTH, als auch durch JM-Applikation induziert (s. Abb. 3.5, 3.6, 3.8 und Tab. 3.3). Die Transkriptakkumulation nach BTH-Applikation blieb auf das Blattmesophyll beschränkt (s. Abb. 3.6). Falls das Thionin direkte an der Abwehr von *Bgh* beteiligt sein sollte, muss ein Transport der mRNA oder des Proteins (ca. 6 kDa) aus dem Mesophyll zur Interaktionsstelle in die Epidermis vorausgesetzt werden, der erst durch das Pathogen induziert wird. SA war als Induktor einer Transkriptakkumulation unwirksam (s. 3.3.1.3) und führte bei *Jip-6* ebenfalls nur zu einer schwachen Geninduktion (Kogel *et al.* 1995). Unterschiede in der Reaktion auf exogen appliziertes und endogen erhöhtes JA wurden wie bereits für *Bci-1* diskutiert festgestellt (s. 3.3.2.2 und Tab. 3.3). Applikation weiterer Phytohormone (Ethylen, ABA), Verwundung und Befall von Blattläusen hatten keinen reproduzierbaren Einfluss auf die *Bci-2* Transkriptakkumulation (s. 3.3.2.3, 3.3.2.4, 3.3.3). Die Expression von *Bci-2* war wie die von *Jip-6* weder in kompatiblen oder inkompatiblen Interaktionen mit *Bgh* induziert, noch führte die Inokulation induzierter Pflanzen zu einer Verstärkung der Expression (s. 3.3.4.1; Jarosch, Dissertation in Vorbereitung, Kogel *et al.* 1995). Von weiteren getesteten Pathogenen hatten nur die Nicht-Wirt-Bakterien *Bacillus subtilis* zu späten Zeitpunkten (4 und 6 dpi) und DC3000 einen Tag nach der Infiltration einen induzierenden Einfluss auf die Genexpression (s. Abb. 3.13, Tab. 3.3 und 4.1). Eine geringere und spätere Akkumulation von *Jip-6* mRNA nach Applikation eines *B. subtilis*-Extraktes (B50) im Vergleich zu DCINA, korrelierte mit der durch B50 schwächer ausgeprägten induzierten Resistenz (Kogel *et al.* 1995). Für *Bci-2* besteht also eine Korrelation von Genaktivität und Resistenzinduktion durch DCINA, BTH und *B. subtilis*.

Für das Thionin ist eine Rolle als Abwehrkomponente bei der IR aufgrund der antimikrobiellen Wirkung denkbar.

4.2.5 BCI-3/BCI-6: Saure Phosphatasen

Saure Phosphatasen gehören zu einer vielfältigen Gruppe von Enzymen, die erheblich in Größe, gewebespezifischer und subzellulärer Lokalisierung, sowie in ihrer Regulation variieren (Williamson & Colwell 1991). Sie können anorganisches Phosphat (Pi) von verschiedenen Substraten abspalten und sind als vegetative Speicherproteine vornehmlich in dikotylen Pflanzen bekannt. Sie können entwicklungsabhängig, bei Verwundung, Hypersensitiver Reaktion, Trocken- und Salzstress, sowie jasmonatinduziert akkumulieren und durch Phosphatgabe reprimiert werden (Berger *et al.* 1995, Creelmann & Mullet 1997b, del Pozo *et al.* 1999, De Wald *et al.* 1992, Kenton *et al.* 1999). Eine Beteiligung von sauren Phosphatasen an der Mobilisierung und Rückgewinnung von Pi durch Dephosphorylierung von Substanzen in absterbendem Gewebe während der Seneszenz, HR oder Verwundung wird als mögliche Funktion diskutiert (del Pozo *et al.* 1999, Duff *et al.* 1994, Kenton *et al.* 1999).

Das nach chemischer Resistenzinduktion differentiell exprimierte **Bci-3** besitzt Homologie zu einer sauren Phosphatase aus Soja, die in Wurzelknöllchen stark akkumuliert und erhöhte Enzymaktivität zeigt (Penheiter *et al.* 1997). Diese Phosphatase scheint für einen effizienten Stoffwechsel des Knöllchens wichtig zu sein, und besitzt ihrerseits Homologie zu anderen vegetativen Speicherproteinen aus Soja. Die Geninduktion einer sauren Phosphatase durch DCINA, BTH oder SA (s. Abb. 3.4 [Klon 2-13], 3.5, 3.6, 3.7, 8.7) wurde bisher nicht beschrieben. Die Akkumulation von *Bci-3* war nach BTH-Induktion in *Northern Blot*-Analysen nur im Mesophyll nachweisbar (s. 3.3.1.2, Abb. 3.6), weitere Untersuchungen mit der sensitiveren Nachweismethode der RT-PCR zeigten jedoch eine Induzierbarkeit auch in der Epidermis (Ruth Eichmann, IPAZ Gießen, pers. Mitteilung). Durch Ethylen und ABA wurde die Expression von *Bci-3* nicht beeinflusst, durch JA-Applikation und Verwundung wie für andere saure Phosphatasen bereits beschrieben jedoch induziert (Berger *et al.* 1995, Creelmann & Mullet 1997b, Kenton *et al.* 1999; s. Abb. 3.8, 3.11 und Tab. 3.3). Im Gegensatz zur Induktion durch JA-Applikation wurde *Bci-3* bei erhöhtem endogenen JA-Gehalt nach Sorbitbehandlung reprimiert (s. Abb. 3.9). Dieser gegensätzliche Effekt war nicht nur auf Transkriptebene sichtbar, sondern auch in Expressionsstudien mit *Bci-3*-Promoter:*GFP*-Reporter Konstrukten. Nach transienter Transformation von Gerstenblättern wurde die GFP-Fluoreszenz durch exogenes JM verstärkt und durch endogen erhöhte JA-Gehalte reprimiert (Uta Geldermann, IPAZ Gießen, pers. Mitteilung). Der Anstieg des endogenen JA-Gehaltes durch 'Floaten' auf Sorbit wird durch starken osmotischen Stress hervorgerufen, der zusätzlich einen Anstieg des ABA-Gehaltes verursacht (Lehmann *et al.* 1995), so dass andere Mechanismen als die

Akkumulation von JA zur Repression von *Bci-3* führen könnten. Für die Genexpression von *Jip-23* konnte die Unabhängigkeit der Induktion von osmotischem Stress, Kohlenhydraten und ABA gezeigt und die Notwendigkeit eines erhöhten endogenen JA-Gehaltes nachgewiesen werden (Wasternack 1994). Während die Inokulation von Gerste mit *C. sativus*, Infiltration des toxischen Kulturfiltrates des Pilzes (nicht gezeigt), die Inokulation mit dem Nicht-Wirt-Pathogen *Bgt* sowie der Schädling *S. avenae* keinen Einfluss auf die Transkriptakkumulation hatte, wurde *Bci-3* durch Befall mit einer virulenten und avirulenten Rasse von *Bgh* reprimiert (s. Tab. 3.3 und Abb. 8.8). Diese Repression könnte ebenso wie bei der Sorbitbehandlung (s.o.) Ausdruck eines geänderten Stoffwechsels in der Interaktion mit dem biotrophen Pathogen sein, der aber wahrscheinlich nicht im Zusammenhang mit Resistenz steht, da die Expression von *Bci-3* auch in der kompatiblen Interaktion reprimiert wurde. Bisher wurde die Repression von sauren Phosphatasen durch Phosphatzufuhr, Auxin, Ascorbat und H₂O₂ beschrieben, wobei H₂O₂ auch als Induktor der Expression fungieren kann (Beck *et al.* 1999, Berger *et al.* 1995, del Pozo *et al.* 1999). Eine gegensätzliche Regulation wurden auch in verschiedenen Interaktionen von Pflanzen mit anderen Organismen festgestellt. So wurde die Repression einer sauren Phosphatase in mycorrhizierten Wurzeln von *Medicago truncatula* und der Anstieg der Aktivität in Interaktionen von Tomate mit Nematoden beschrieben (Liu *et al.* 1998, Williamson & Colwell 1991). Die Genexpression nach Infiltration mit Bakterien war nur in einem von zwei durchgeführten Experimenten geringfügig aktiviert und scheint daher nicht in kausalem Zusammenhang mit Bakterien zu stehen (s. Abb. 3.14). Ebenso wie für *Bci-1* konnte in Weizen ein *Bci-3*-Homolog nachgewiesen werden, das sehr früh und stark während der cIR akkumulierte (s. Abb. 3.16). Ob die Genexpression durch Befall mit dem Echten Weizenmehltaupilz ebenfalls reprimiert wird, wurde nicht überprüft, so dass keine Aussage über die Repression der sauren Phosphatase als generelle Erscheinung in Interaktionen von Getreide mit Echten Getreidemehltaupilzen getroffen werden kann. Die starke Induktion der *Bci-3*-Genexpression bei der cIR könnte zu einer Verarmung an freien Aminosäuren durch Verwendung bei der Proteinsynthese von BCI-3 führen, die eindringenden Pathogenen die Ernährung erschweren könnte. Die starke Akkumulation von BCI-3 könnte aber auch eine verstärkte Verfügbarkeit von Phosphat in der Zelle bewirken. Erste transiente Überexpressionsanalysen mit *Bci-3* konnten jedoch keinen Einfluss auf die Interaktion mit *Bgh* nachweisen (Eichmann, unveröffentlicht). Das heisst, dass *Bci-3* alleine bei Expression in der Epidermis nicht ausreichend für die Abwehr von Pathogenen ist, im Zusammenspiel mit anderen Komponenten aber dennoch eine Funktion bei der cIR besitzen könnte, die in weiteren Untersuchungen geklärt werden muss.

Als weitere Phosphatase wurde ***Bci-6*** identifiziert, das die größte Ähnlichkeit zu einem putativen *Arabidopsis*-Protein mit Ähnlichkeit zu einer sauren Phosphatase aus *Phaseolus vulgaris* (PAP-protein, *purple acid phosphatase*) aufweist. Die Genexpression von *Bci-6*

stimmt weitgehend mit der von *Bci-3* überein (s. Tab. 3.3), und zeichnet sich durch Aktivierung während der cIR (s. Abb. 3.4, 3.5, 3.6 und 8.7), durch JM-Applikation (s. Abb. 3.8) und Verwundung (s. Abb. 3.11), sowie durch Repression in inkompatiblen Interaktionen von Gerste mit *Bgh* (s. Abb. 8.8) aus. Im Unterschied zu *Bci-3* wurde die Expression nach Sorbitbehandlung nicht reprimiert und in Weizen oder Reis keine Transkriptakkumulation eines Homologen nach BTH-Applikation detektiert.

Die Tatsache, dass die Expression beider Phosphatasen während der cIR und in inkompatiblen Interaktionen mit *Bgh* ein gegensätzliches Induktionsverhalten zeigen, spricht für unterschiedliche Signalwege und/oder Mechanismen der Resistenzausprägung bei der cIR und resistenzgenbedingten Resistenz.

4.2.6 BCI-4: Ca^{2+} -bindendes *EF-hand*-Protein

Calcium gilt auch in Pflanzen als *second messenger*, der eine Vielzahl verschiedener externer Stimuli abiotischen oder biotischen Ursprungs mit einer charakteristischen intrazellulären Reaktion verbinden kann (McAinsh & Hetherington 1998). Die Spezifität des Signalweges ist dabei abhängig von der Kompetenz der Zelle auf den jeweiligen Stimulus zu reagieren (Expression der entsprechenden Signalkomponenten), von der Ca^{2+} -Signatur (Lokalisierung, Dauer und Amplitude des Ca^{2+} -Signals) und die Nähe der Transduktionselemente zum Ca^{2+} -Signal (McAinsh & Hetherington 1998). Ca^{2+} -bindende Proteine können regulatorisch wirksam sein und nach der Bindung eine Konformationsänderung vollziehen (Ca^{2+} -Sensor), oder Speicher- und Transportfunktionen besitzen (Ca^{2+} -Puffer, Ikura 1996). Dabei ist die Bindungsaffinität der Pufferproteine für Calcium im allgemeinen höher als die der Sensorproteine. *EF-hand*-Proteine zeichnen sich typischerweise durch ein oder mehrere Paare von Helix-Turn-Helix-Motiven (2-8 *EF-hands*) aus, die jedoch auch einzeln vorkommen können und für die Ca^{2+} -Bindung verantwortlich sind (Ikura 1996).

Die kodierende Sequenz von *Bci-4* besitzt Homologie zu Ca^{2+} -bindenden *single EF-hand*-Proteinen aus *Arabidopsis*, Sesam, Soja und Reis, und ist nahezu identisch zu einem Homolog aus Weizen (EST, s. Abb. 3.17). Gemeinsamkeiten dieser Untergruppe von *single EF-hand* Proteinen sind das N-terminale Ca^{2+} -Bindemotiv, eine zentrale hydrophobe Domäne und eine potentielle C-terminale Phosphorylierungsstelle. Proteine dieser Gruppe wurden bisher nur in höheren Pflanzen beschrieben, für eine einzellige Alge (*Chlorella protothecoides*) und für einige Pilze, die Lipide akkumulieren können (Murphy *et al.* 2000). In Abweichung von den übrigen Sequenzen des *Alignments* (s. Abb. 3.17) besitzen BCI-4 und der Weizen-EST ein potentielles Signalpeptid für den Import ins ER und zwei sich überlagernde Leucin(L)-*Zipper*-Motive, die Protein-Protein-Interaktionen vermitteln könnten. Eine L-*Zipper*-vermittelte DNA-Bindung nach Dimerisierung ist allerdings

unwahrscheinlich, da der angrenzenden Sequenz dafür notwendige positiv geladene oder basische Aminosäuren fehlen (Lewin 1994). Ein zu BCI-4 homologes Protein wurde zuerst in Reis in sich entwickelnden und keimenden Samen identifiziert und wird in vegetativem Gewebe bei osmotischem Stress und durch ABA-Applikation exprimiert (Frandsen *et al.* 1996). In *Arabidopsis* und Sesam wurden Homologe in Assoziation mit Oleosomen und dem ER identifiziert und als Caleosine bezeichnet (Chen *et al.* 1999, Næsted *et al.* 2000, Nuccio & Thomas 1999, Takahashi *et al.* 2000). Eine Beteiligung an Ca^{2+} -vermittelter Fusion von Membranen und Ölkörperchen bzw. eine generelle Funktion in Transportvorgängen zwischen ER und Vesikeln wurde postuliert (Næsted *et al.* 2000, Murphy *et al.* 2000). Verschiedenen Isoformen der *Arabidopsis* Caleosine werden in Wurzeln und jungen Blättern, bei Trocken- und Salzstress und durch ABA-Applikation in vegetativem Gewebe oder während der Reifung und Entwicklung von Samen exprimiert (Chen *et al.* 1999, Næsted *et al.* 2000, Nuccio & Thomas 1999, Takahashi *et al.* 2000).

Demgegenüber ist die Genexpression von *Bci-4* anders reguliert; sie war nur mit den Resistenzinduktoren SA, DCINA und BTH induzierbar (s. Abb. 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.19), wobei die schwächere und transiente Expression nach SA-Applikation mit der geringeren Ausprägung der Resistenz korrelierte (s. Abb. 3.3). Nach JM-Applikation konnte nur in einem Genotyp eine transiente und schwache Transkriptakkumulation detektiert werden, die daher wahrscheinlich nicht kausal mit der JM-Applikation verknüpft ist, zumal bei endogen erhöhtem JA-Gehalt ebenfalls keine Akkumulation erfolgte (s. Abb. 3.8). Eine schwache aber reproduzierbare Expression von *Bci-4* wurde nach Infiltration des Pseudomonadenstammes PG4180 lokal und systemisch nachgewiesen und korrelierte mit einer Resistenzinduktion gegenüber *Bgh* (s. Abb. 8.10, 3.14, 4.1). Alle anderen untersuchten Induktoren, verschiedenste biotische und abiotische Stressfaktoren, sowie Fungizidapplikationen hatten keinen Einfluss auf die Expression von *Bci-4* (s. Tab. 3.3; s. 3.4 und Tab. 4.1). Dies zeigt, dass *Bci-4* nicht bei allgemeinen Stressreaktionen exprimiert wird, sondern spezifisch reguliert ist. In Weizen wurde ein chemisch induziertes Homolog von *Bci-4* nachgewiesen (s. Abb. 3.16). Ob die Regulation dieses Homologs in Weizen mit der in Gerste übereinstimmt, muss noch im Detail gezeigt werden. Hypothesen über einen konservierten Mechanismus der cIR in Getreide werden durch den Nachweis des *Bci-4*-Homologs in Weizen jedoch unterstützt.

Tab. 4.1 Expressionsprofil von *Bci-4*.

Kategorie	Signal	Expression
♦ Resistenzinduktor	SA, DCINA, BTH	+
♦ Phytohormon	JA/JM, Ethylen, ABA	-
♦ Verwundung	Perforation	-
♦ Pathogen (avirulent und virulent)	Biotrophe, Nekrotrophe, Toxin	-
♦ Nicht-Wirt-Pathogen	<i>Blumeria graminis</i> f.sp. <i>tritici</i> Pseudomonaden (PG4180)	- (+)
♦ Schädling	Blattläuse	-
♦ abiotischer Stress	Trockenheit*, Salz ¹ , Säure ¹ , Hitze*	-
♦ oxidativer Stress	Paraquat (O ²⁻)*, H ₂ O ₂ *	-
♦ Fungizid	Carpropamid*, Tricyclazol*, Strobilurin*	-

¹Achim Wiese, Institut für Pflanzenernährung, JLU Gießen. *nicht gezeigt.

Eine verstärkte Akkumulation von *Bci-4*-Transkript und -Protein in Gerstenpflanzen erfolgte ausschließlich in Blättern (mit Ausnahme des Fahnenblattes) und nur nach chemischer Induktion (BTH-Gießbehandlung), wobei die Akkumulation auf das Mesophyll begrenzt blieb, wie *Northern*- und *Western*-Analysen zeigen konnten (s. Abb. 3.6, 3.20). Nach erfolgreicher Herstellung und Aufreinigung von rekombinantem BCI-4 (s. Abb. 3.18) konnte die Expression mit Hilfe von polyklonalen Anti-BCI-4-Antikörpern untersucht werden. Anders als auf mRNA-Ebene wurden in Proteinextrakten von Blättern (einschließlich Fahnenblatt), der Ähre und der interzellulären Waschflüssigkeit mehrere mit Anti-BCI-4-Antikörpern kreuzreagierende Proteine detektiert (s. Abb. 3.20 B). Diese wurden jedoch nicht durch BTH induziert, sondern konstitutiv exprimiert, ebenso wie wahrscheinlich auch BCI-4 oder eine Isoform schwach konstitutiv in Kontrollen der ersten bis vierten Blatttage exprimiert war. Diese konstitutive Expression von BCI-4 war sowohl in der Epidermis als auch im Mesophyll auf Protein- und Transkriptebeine, letztere nur in RT-PCR-Analysen, nachweisbar (s. Abb. 3.21, 3.22 A und B). Das Fehlen einer erhöhten Akkumulation von BCI-4 in Fahnenblättern nach chemischer Induktion könnte darauf zurückzuführen sein, dass in diesem Stadium der Transport von Assimilaten hauptsächlich zur Ähre geleitet wird, um eine Kornfüllung zu gewährleisten, so dass vielleicht auch die Verlagerung von BTH in das Fahnenblatt weniger stark ausgeprägt ist. Möglicherweise war auch die Induktionsphase mit drei Tagen bis zur Ernte zu kurz, um eine ausreichende Konzentration von BTH im Fahnenblatt zu gewährleisten und die Genexpression zu aktivieren. Durch eine Sprühapplikation von BTH ließe sich überprüfen, ob die Induktion von BCI-4 in den oberen Pflanzenteilen prinzipiell erfolgen kann.

Eine Aktivierung der Expression in kompatiblen oder inkompatiblen Interaktionen mit dem Echten Gerstenmehltaupilz konnte auf Transkriptebeine (*Northern*-Analyse, RT-PCR) nicht nachgewiesen werden. In der durch das Resistenzgen *Mlg*-vermittelten Interaktion mit *Bgh*

konnte *Bci-4* weder auf Protein- noch auf Transkriptebene (RT-PCR) in Epidermis oder Mesophyll detektiert werden (s. Abb. 3.22). Die Expression des pathogeninduzierten *PR-1b* - hier genutzt als Positivkontrolle - war dagegen erhöht. Ging der Inokulation jedoch eine chemische Induktion voraus, so wurde die *Bci-4*-Expression acht Stunden nach der Inokulation zusätzlich erhöht (*priming*), was auf eine Bedeutung von *Bci-4* in der Interaktion mit dem Pathogen, bzw. für Abwehrreaktionen hindeuten könnte.

Zur subzellulären Lokalisierung von BCI-4 in der Zelle wurden Plasmide für BCI-4 Fusionsproteine mit *GFP* als Reporter konstruiert und mittels Partikelbeschuss intakter Epidermiszellen von *Arabidopsis*- und Gerstenblättern sowie *Allium*-Zwiebeln überexprimiert. Die Fluoreszenz einer im Cytoplasma lokalisierten GFP-Kontrolle war in allen Epidermen nachweisbar, die Fluoreszenz der im ER lokalisierten GFP-Kontrolle in Epidermen von *Arabidopsis* und *Allium cepa*, und die des BCI-4:GFP Fusionsproteins nur in *Allium cepa*-Zellen (s. Abb. 3.23). Die Konstrukte standen alle unter Kontrolle des gleichen 35S-Promoters, so dass anzunehmen ist, dass die Expression gleichermaßen erfolgte und möglicherweise zell- oder artspezifische Faktoren für die unterschiedliche GFP-Aktivität verantwortlich waren. Eine Lokalisation von BCI-4 im ER, wie für Caleosine beschrieben, erscheint aufgrund der beobachteten Verteilung der Fluoreszenz in Zwiebelepidermen möglich (s. Abb. 3.23). Eine Lokalisierung im Zellkern, in der Vakuole oder Plasmamembran kann ausgeschlossen werden. Der Nachweis von BCI-4 in der Mikrosomenfraktion chemisch induzierter Gerstenblätter, nicht aber in der Plasmamembranfraktion oder in Fraktionen unbehandelter Blätter, liefert einen weiteren Hinweis für eine Lokalisierung von BCI-4 in Assoziation mit dem ER (Gregor Langen, Elke Stein, IPAZ Gießen, pers. Mitteilung). Eine verlässliche subzelluläre Lokalisierung in Gerstenblättern ließe sich mit einer *in situ*-Immunolokalisierung unter Verwendung monoklonaler Antikörper erreichen und würde auch die Überprüfung möglicher Unterschiede in der Lokalisierung zwischen verschiedenen Geweben (z.B. Mesophyll und Epidermis) zulassen. Aber auch die Herstellung eines Plasmides für ein Fusionsprotein von BCI-4 ohne Signalpeptid (ORF2) und GFP und anschließende Überexpression in Epidermen könnte durch den direkten Vergleich weiteren Aufschluss über die Lokalisierung von BCI-4 geben.

Eine Funktion von BCI-4 bei der Resistenz gegenüber *Bgh* konnte durch die Überexpression in Gerstenepidermiszellen nachgewiesen werden. Die Penetrationsrate attackierter Epidermiszellen durch den Pilz wurde in transformierten Zellen in fünf von sechs Experimenten um 20 bzw. 50 % reduziert (s. Abb. 3.24). Da die Coexpressionsrate von Reportergen und Testgen bei 70 % liegt, wird der Einfluss des Testgens prinzipiell unterschätzt (Schweizer *et al.* 1999). Zellen, die nur das Testgen enthalten, werden aufgrund fehlender Markierung nicht ausgewertet und die, die nur das Reportergen enthalten, unterscheiden sich nicht von den Kontrollen. Die Unterschiede in der Effizienz

der Resistenzinduktion durch Überexpression zwischen den Experimenten beruhen möglicherweise auf Verwendung unterschiedlicher Gerstensorten oder auf unterschiedlichen Anzuchtbedingungen, da die Experimente 1 und 2 im Institut für Botanik, Universität Zürich, Schweiz mit den Sorten Pallas und Golden Promise, die Experimente 3 bis 6 jedoch im IPAZ, Gießen mit der Sorte Ingrid durchgeführt wurden (s. Abb. 3.24). Ein direkter Vergleich der verschiedenen Sorten unter denselben Bedingungen könnte zur Klärung dieser möglichen Ursache für den unterschiedlichen Grad der Resistenzsteigerung beitragen. Andererseits könnte auch die Verwendung von *GFP* als Reportergen für die schwächere Resistenzinduktion durch BCI-4 in den Experimente 4-6 im Vergleich zu den Experimenten mit GUS Coexpression verantwortlich sein. GFP-Fluoreszenz ist nur in lebenden Zellen sichtbar, an der Abwehr von *Bgh* kann jedoch eine HR beteiligt sein, die zum Absterben der Zellen führt. Dadurch gingen dann möglicherweise weniger BCI-4-überexprimierende resistente Zellen in die Auswertung ein, als eigentlich vorhanden waren. In einem Experiment wurde ein um das potentielle Signalpeptid verkürztes BCI-4 (ORF2, -39 aa) überexprimiert. Ein Einfluss auf die Wirt-Pathogen-Interaktion wurde nicht festgestellt, da keine erhöhte Penetrationsresistenz gegenüber *Bgh* beobachtet wurde (s. Abb. 3.24 [6]). In weiteren Experimenten muss die Bedeutung der korrekten subzellulären Lokalisierung für die Funktion von BCI-4 bei der Resistenzhöhung bestätigt werden. Außerdem sollte in Experimenten, in denen die Expression von BCI-4 nach Applikation chemischer Resistenzinduktoren unterdrückt wird, überprüft werden, ob weiterhin Resistenz gegenüber *Bgh* ausgelöst werden kann, um eine Abhängigkeit der cIR von der BCI-4-Akkumulation nachzuweisen.

Die Daten erlauben die Annahme einer zentralen Funktion von BCI-4 in der cIR, da nicht nur die Genexpression mit der Resistenzinduktion gegenüber *Bgh* korreliert, sondern nach Überexpression von BCI-4 auch eine Zunahme der Resistenz gegen *Bgh* nachgewiesen werden konnte. Die Proteinsequenz von BCI-4 und besonders das *single EF-hand*-Motiv führen zu der Hypothese über eine Rolle von BCI-4 als Signaltransduktionselement. Allerdings gibt die Überexpression von BCI-4 durch transiente Transformation von Epidermiszellen nicht die Situation nach chemischer Resistenzinduktion wieder, da bei der cIR eine Akkumulation von BCI-4 im Mesophyll erfolgte. Möglicherweise bleibt die Akkumulation hier auf das Mesophyll beschränkt, da die Nähe zu bestimmten Elementen des Mesophylls wie z.B. Chloroplasten zur Induktion notwendig sein könnte. Es wäre denkbar, dass die Funktion von BCI-4 in der Beteiligung an der Kommunikation zwischen Mesophyll und Epidermis liegt, indem BCI-4 für die Bildung eines Signals verantwortlich ist, das zwischen den Geweben ausgetauscht werden kann. So könnten in chemisch induzierten Pflanzen nach Erkennung von *Bgh* Signale ins Mesophyll und über BCI-4 zurück in die Epidermis geleitet werden, die dann zur Auslösung von Abwehrreaktionen in der Epidermis führen (Abb. 4.2 A). Werden anfällige Gerstenpflanzen chemisch induziert,

könnte BCI-4 die schnellere unspezifische Erkennung des Pathogens oder Signalweiterleitung und damit die Auslösung der Abwehr ermöglichen, wobei die *Bci-4* Expression durch das Pathogen noch zusätzlich induziert wird (*priming*, s. Abb. 3.12). Bei der künstlichen Überexpression von BCI-4 in der Epidermis würde das hypothetische Signal über BCI-4 direkt in der Epidermis generiert werden und dort genauso wie nach Transport aus dem Mesophyll für die Auslösung der Abwehrreaktionen sorgen (Abb. 4.2 B). In der resistenzgenvermittelten Resistenz wurde *Bci-4* nicht exprimiert, da hier die Funktion von BCI-4 vermutlich von Komponenten des spezifischen Resistenzsignalweges übernommen wird. Ob die geringe konstitutive Expression von *Bci-4* einen Einfluss auf die Interaktion mit *Bgh* hat, muss in Experimenten, in denen die Expression von *Bci-4* reprimiert wird (z.B. *RNA interference*, RNAi), gezeigt werden. Die Ergebnisse für *Bci-4* weisen auf die Existenz zumindest teilweise unterschiedlicher Signalwege der cIR und der resistenzgenvermittelten Resistenz im Pathosystem Gerste - *Bgh* hin, wobei der (cytologisch nachweisbare) Abwehrmechanismus selber besonders bei chemisch induzierter und *Mlg*-vermittelter Resistenz sehr ähnlich ist (s. 4.1).

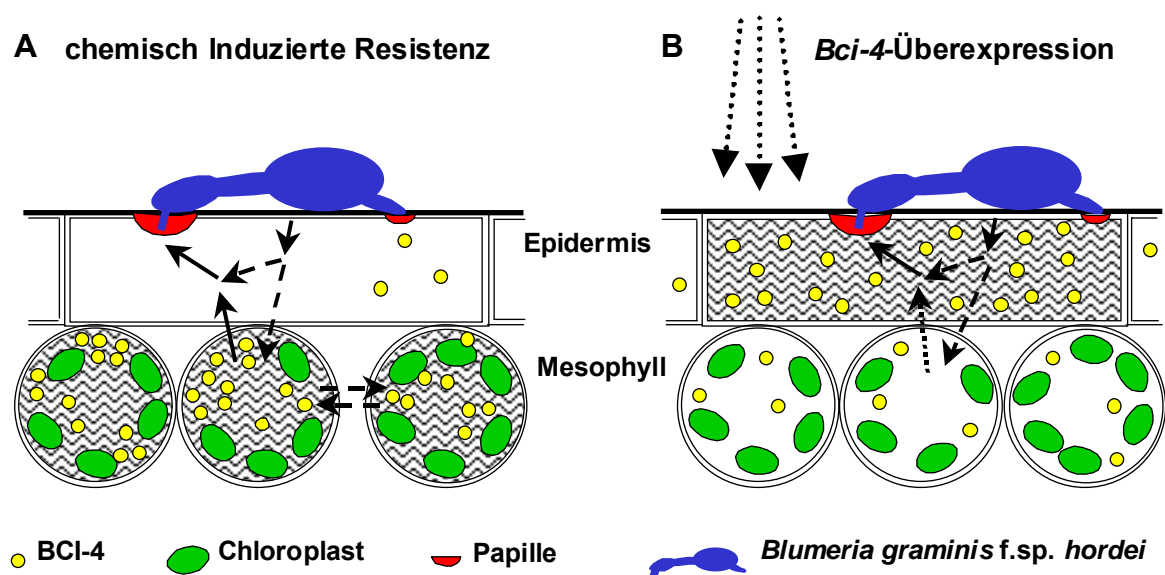


Abb. 4.2 Vergleich der cIR mit der transienten Überexpression von *Bci-4*.

A Bei Applikation chemischer Resistenzinduktoren akkumuliert sowohl mRNA als auch Protein im Mesophyll, wodurch die Pflanze in den Zustand erhöhter Abwehrbereitschaft versetzt wird. Bei Angriff des Echten Gerstenmehltaupilzes (*Bgh*) entstehen Signale in den Wirtszellen, die bei der cIR effektive Abwehrmechanismen wie Papillenbildung auslösen können. BCI-4 vermittelt dabei den Signalaustausch zwischen Epidermis und Mesophyll. **B** Durch transiente Überexpression mittels Partikelbeschuss (PIG, *particle inflow gun*) akkumuliert BCI-4 in Epidermiszellen. Die Akkumulation des Proteins in der Epidermis ist ausreichend für die Auslösung erfolgreicher Abwehrmechanismen.

Die Herstellung stabil transgener Pflanzen, die *Bci-4* überexprimieren, ist für eine Einordnung von BCI-4 in den Signalweg der Induzierten Resistenz und die genaue Charakterisierung der Funktion notwendig. Eine mögliche Bedeutung von BCI-4 für Resistenz gegenüber verschiedenen Pathogenen muss an stabil Transgenen untersucht werden, da z.B. die Interaktion mit Nekrotrophen nicht auf Einzelzellreaktionen in der Epidermis beschränkt bleibt und das transiente Überexpressionssystem mittels Partikelbeschuss hier nicht aussagekräftig ist. Auch eine Bedeutung von BCI-4 in Wirt-Pathogen-Interaktionen anderer Pflanzenarten könnte an Transgenen getestet werden. Besonders interessant wäre die Herstellung von *Arabidopsis*-Transgenen und die Überprüfung einer Funktion von BCI-4 in Resistenzreaktionen, wobei die Einbeziehung von Signalwegmutanten aufschlussreich sein könnte. Bisher war die stabile Transformation verschiedener Pflanzenarten mit BCI-4 in Kooperation mit verschiedenen anderen Instituten und im eigenen Labor nicht erfolgreich. Die Deregulation der *Bci-4*-Expression scheint zumindest in bestimmten Stadien oder bei der Regeneration von Pflanzen aus Kalli oder Samen ungünstig zu sein.

4.2.7 BCI-5: Plastidenspezifisches ribosomales Protein

Das identifizierte cDNA-Fragment von *Bci-5* besitzt Ähnlichkeiten zu RNA- oder Einzelstrang-DNA-bindenden Proteinen von *Arabidopsis* und *Vicia faba* und stimmt mit der Sequenz des Vorläufermoleküls für das plastidenspezifische ribosomale Protein 2 (*Psrp-2*) von Spinat am besten überein. Das Gen ist plastidencodiert, wird als Bestandteil der chloroplastidären 30S-Untereinheit beschrieben und besitzt Homologien zu RNA-bindenden Proteinen des Stromas, die an mRNA-Prozessierung und -Stabilisierung beteiligt sind (Yamaguchi *et al.* 2000). Für die insgesamt vier identifizierten PSRPs der 30S-Ribosomenuntereinheit wurde eine Funktion als Regulatormodul der kernfaktorvermittelten plastidären Translation postuliert (Yamaguchi *et al.* 2000). Das Gerstenhomolog *Bci-5* scheint wie in Spinat ebenfalls auf dem Plastidengenom lokalisiert zu sein, da auf dem gleichen genomischen Fragment ein weiteres plastidäres Protein codiert ist (Uli Beckhove, IPAZ Gießen, pers. Mitteilung). Eine differentielle Regulation von *Bci-5* wurde nur durch DCINA und BTH nachgewiesen, die in Übereinstimmung mit einer chloroplastidären Lokalisation im Mesophyll auftrat (s. Abb. 3.4, 3.5, 8.5, 3.6 und Tab. 3.3). Allerdings waren die Effekte in unabhängigen Versuchen widersprüchlich, so dass keine cIR-spezifische Funktion angenommen werden kann. Geringfügige Transkriptakkumulation nach Infiltration des Bakteriums DC3000 (s. Abb. 8.10, 3.14) und eine leichte Repression fünf Tage nach Blattlausbefall (s. Abb. 3.15) geben Hinweise auf eine mögliche pathogenbedingte Beeinflussung des Chloroplastenstoffwechsels.

4.2.8 BCI-7: Serin-Proteinaseinhibitor

Proteaseinhibitoren sind Proteine, die proteolytisch wirkende Enzyme hemmen können, wobei Serin-Proteinaseinhibitoren spezifisch Serin-Endopeptidasen inhibieren (Ryan 1990). Proteinaseinhibitoren akkumulieren in Pflanzen bei der Samen-, Knollen- und Fruchtbildung und ihre Expression kann bei Schädigung durch Herbivore, Befall von Pathogenen und Viren, sowie bei Verwundung lokal und systemisch induziert werden (Cordero *et al.* 1994, Gadea *et al.* 1996, Koiwa *et al.* 1997, Ryan 1990, Tamayo *et al.* 2000). Die Schutzfunktion von Proteinaseinhibitoren kann neben der Hemmung des Proteinauflusses der Nahrung auch auf einer toxischen Wirkung gegenüber Insekten und Nematoden bestehen (Koiwa *et al.* 1997, Ryan 1990, Urwin *et al.* 1997). Bei Pathogenbefall können Proteinaseinhibitoren möglicherweise das Eindringen des Pathogens durch Hemmung der Proteolyse erschweren und eingrenzen, indem die Verfügbarkeit von Aminosäuren für die Entwicklung des Pathogens limitiert wird (Ryan 1990). Eine Korrelation von Proteinaseinhibitorgehalt in pflanzlichem Gewebe und Insekten- und Pathogenresistenz wurde beobachtet und der Schutz vor Insektenfraß durch Überexpression in transgenen Pflanzen bestätigt (Koiwa *et al.* 1997, Ryan 1990). Subtilisin-Inhibitoren, die zu den Serin-Proteinaseinhibitoren gehören und hauptsächlich aus Leguminosen und Getreide isoliert wurden, zeigen spezifische Aktivität gegenüber Proteinase von Mikroorganismen und weniger gegenüber tierischen Proteinase (Ryan 1990). Als Regulatoren der Genexpression von Proteinaseinhibitoren wurden ABA und JA/JM beschrieben (Farmer *et al.* 1992, Koiwa *et al.* 1997).

Das im SSH-Ansatz identifizierte Gen für einen Serin-Proteinaseinhibitor (*Bci-7*) ist homolog zu einem Chymotrypsin/Subtilisin-Inhibitor aus Mais, dessen Expression in keimenden Embryonen, nach Pilzinfektion, lokal und systemisch nach Verwundung von keimenden Embryonen und Blättern, sowie durch ABA- und JM-Applikation aktiviert wird (Cordero *et al.* 1994). Damit scheint das Induktionsmuster des Proteinaseinhibitors in Mais dem von Dikotylen zu entsprechen. In Gerste ist die Situation anders, da die Genexpression von *Bci-7* durch die chemischen Resistenzinduktoren SA, DCINA und BTH in Epidermis und Mesophyll aktiviert wurde (s. Abb. 3.4, 3.5, 3.6, 3.7). Zusätzlich waren die Phytohormone Ethylen und Jasmonat (exogen und endogen), sowie Verwundung der Blätter wirksame Induktoren der Transkriptakkumulation (s. Abb. 3.8, 3.9, 3.10, 3.11). ABA hatte keinen Effekt, wodurch die Beobachtung, dass in Gerste der JA-Signalweg unabhängig von ABA ist, bekräftigt werden konnte und sich damit vom Signalweg in Dikotylen unterscheidet (Lee *et al.* 1996). Der mit Abwehrreaktionen assoziierte Proteinaseinhibitor kann in Gerste demnach sowohl durch typische Induktoren von Krankheitsresistenz, als auch durch Induktoren von Insektenresistenz aktiviert werden. Während die *Bci-7* Expression in Interaktionen von Gerste mit *Bgh* möglicherweise durch

Suppressoren des Pilzes reprimiert wurde (s. Abb. 8.8) und in Infektionen mit *C. sativus*, *Bgt* und *S. avenae* nicht verändert war (s. Tab. 3.3), konnte eine deutliche Induktion durch *Rhynchosporium*-Befall und nach Infiltration von DC3000 in Blättern nachgewiesen werden (s. Abb. 3.13, 3.14). Beide Pathogene verursachten die Bildung relativ großflächiger nekrotischer Bereiche, die möglicherweise für die Genaktivierung verantwortlich waren. Allerdings hatte die Infiltration von Pss61 eine ähnlich starke Läsion verursacht ohne eine Geninduktion auszulösen (s. Abb. 4.1). Zudem wurde durch die Infiltration von DC3000 nur in einem von zwei Experimenten eine starke Expression von *Bci-7* induziert. Die Unterschiede zwischen den Experimenten lassen sich möglicherweise mit der Verwendung verschiedener Blätter für die Bakterieninfiltration erklären: Im ersten Versuch wurde nur das Primärblatt infiltriert und die systemische Induktion im Sekundärblatt überprüft, während im zweiten Versuch das Primär- und das Sekundärblatt infiltriert und systemische Effekte im dritten und vierten Blatt evaluiert wurden. Eine abweichende Reaktion im Besonderen von Primär- und Sekundärblatt auf die Infiltration in Bezug auf die Bildung eines systemischen Signals wäre denkbar. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um zu klären, ob die Induktion von *Bci-7* durch bestimmte Pathogene ausgelöst werden kann und damit in der spezifischen Interaktion eine Rolle spielen könnte, oder ob die Induktion in Wirt-Pathogen-Interaktionen einen Folgeeffekt durch entsprechende Schädigung des Wirtsgewebes darstellt. Zusätzlich sollte die antimikrobielle Wirkung und der Effekt des Proteinaseinhibitors auf Herbivore überprüft werden. Aus Sicht der Nutzung von *Bci-7* in transgenen Pflanzen sollte auch seine mögliche Akkumulation im Korn berücksichtigt und die Futter- bzw. Nahrungsmitteltauglichkeit überprüft werden. In Weizen konnte ein *Bci-7*-Homolog detektiert werden, das ebenfalls nach Induktorgabe und möglicherweise zu späten Zeitpunkten auch nach Befall mit *Bgt* akkumuliert (s. 3.16).

4.2.9 BCI-8: Fettsäuredesaturase

In dem differentiellen Ansatz zur Identifizierung chemisch induzierter Gene wurde ein Fragment (*Bci-8*) mit Homologie zu einer plastidenlokalisierten ω -3-Fettsäuredesaturase aus Weizen (*TaFAD7*) isoliert. Diese Fettsäuredesaturase ist für die Synthese von α -Linolensäure verantwortlich, die den Hauptfettsäurebestandteil der Membranlipide höherer Pflanzen darstellt (Horiguchi *et al.* 1998). *TaFAD7*-Transkriptakkumulation ist lichtreguliert und soll an der Entwicklung von Chloroplasten in grünem Gewebe und insbesondere am Aufbau von Thylakoidmembranen beteiligt sein (Horiguchi *et al.* 1996, 1998).

Die Expression von *Bci-8* war auf das Battmesophyllgewebe beschränkt und wurde durch die chemischen Induktoren DCINA, BTH und SA ausgehend von einem Basislevel reprimiert (s. Abb. 3.5, 3.6, 3.7). Dabei war festzustellen, dass auch die Grundexpression in

Abhängigkeit vom Blattalter abnahm. Da diese Repression in neueren Untersuchungen bei Applikation von BTH und deutlicher Induktion von Resistenz nicht reproduziert werden konnte (Ruth Eichmann, IPAZ Gießen, pers. Mitteilung), hat die Regulation von *Bci-8* vermutlich keinen bedeutsamen Einfluss auf die Ausprägung der Resistenz und stellt möglicherweise eine Begleiterscheinung der Behandlung dar. Als Ursache für die Unterschiede zwischen den Versuchen könnte die Anzucht der Versuchspflanzen in unterschiedlichen Klimakammern mit verschiedenen Temperatur- und Lichtbedingungen in Betracht kommen, die einen Einfluss auf den physiologischen Zustand der Pflanzen oder direkt auf die Genregulation der Fettsäuredesaturase haben könnten. Bei der Behandlung von Gerstenblättern mit JM, Sorbit, Verwundung und teilweise bei Befall mit nekrotisierenden Pathogenen wurde die Expression von *Bci-8* ebenfalls reprimiert (s. Abb. 3.8, 3.9, 3.11, 8.9, 3.13). JM-Applikation hatte in *Arabidopsis*-Blättern den gleichen Effekt auf die Expression einer Desaturase, Verwundung führte jedoch zur Aktivierung der Desaturaseexpression und damit möglicherweise über die Bildung von Signalen des Oxylipinsignalweges zur Induktion einer Wundreaktion (Nishiuchi *et al.* 1997). Die negative Regulation einiger anderer Gene, die für chloroplastidäre Proteine codieren, durch Jasmonat ist z.B. für RubisCo und Chlorophyll a/b-Bindeprotein beschrieben und wird mit Seneszenzsymptomen, wie reduzierte Chlorophyll- und Proteingehalte in Verbindung gebracht (Reinbothe *et al.* 1994). Die Repression der Desaturase könnte Ausdruck einer unspezifischen Stressreaktion sein, in der einige Funktionen des Grundstoffwechsels, wie die Bereitstellung von Substrat für den Aufbau von Membranen, eingeschränkt werden. Eine geringfügige Induktion der *Bci-8*-Genexpression durch einige Bakterien trat nur in einem Experiment auf und war möglicherweise durch Schwankungen des Grundlevels bedingt (s. Abb. 3.14). Nach Inokulation mit *Bgh* konnte sowohl die Induktion als auch die Repression von *Bci-8* beobachtet werden, die sich jedoch nicht mit Resistenz oder Suszeptibilität korrelieren ließ (s. Abb. 8.8). In anderen Untersuchungen wurde in der kompatiblen Interaktion von Gerste und *Bgh* die Abnahme des Gehaltes ungesättigter Fettsäuren in Plasmamembranen festgestellt, die bei Applikation von Resistenzinduktoren nicht erfolgte oder ins Gegenteil verkehrte (Gernns & von Alten 1996). In Petersilie wurde die Akkumulation einer Desaturase durch pilzliche Elicitoren und Pilzbefall in dem an die Infektionsstelle angrenzenden Gewebe nachgewiesen. Erhöhte Enzymaktivität könnte für die Zunahme von Linolensäure und Abnahme von Linolsäure verantwortlich gewesen sein und so die Bildung von Abwehrsignalen ausgelöst haben (Kirsch *et al.* 1997). Für eine abschließende Beurteilung der Rolle von Fettsäuredesaturase in verschiedenen Wirt-Pathogen-Interaktionen und in anderen Getreiden wie Weizen und Reis sind detailliertere Untersuchungen notwendig.

4.2.10 BCI-9: Apyrase

Apyrasen sind Diphosphohydrolasen (EC 3.6.1.5), die verschiedene Nukleosidtri- und -diphosphate hydrolysieren können. Dabei wird zwischen Ekto- und Endoapyrasen unterschieden, je nachdem, ob die katalytische Domäne extra- oder intrazellulär lokalisiert ist (Komoszyński & Wojtczak 1996). Es gibt Hinweise für eine Beteiligung von Apyrasen an Neurotransmission, Aggregation von Blutplättchen, Proteinglycosylierung und Regulation der Membranintegrität (Komoszyński & Wojtczak 1996). In Pflanzen wurden Funktionen bei der Mobilisierung von Phosphat durch eine Ektoapyrase (Thomas *et al.* 1999), bei der Nod-Faktererkennung und Signalweiterleitung in der Symbiose von Leguminosen mit Rhizobien (Etzler *et al.* 1999), sowie die Beteiligung an der Entstehung von Knöllchen als frühes Nodulin (Day *et al.* 2000) beschrieben. Eine weitere Funktion wird bei der Resistenz gegenüber Xenobiotica diskutiert, wobei eine Ektoapyrase den ATP-Gradient über der Plasmamembran aufrechterhalten soll, der den Efflux des Toxins zusammen mit ATP unterstützt (Thomas *et al.* 2000).

Bci-9 hat die höchste Ähnlichkeit zu Ektoapyrasen aus *Dolichos biflorus*, *Arabidopsis thaliana* und *Medicago sativa* (blastx/nr: *lectin-nucleotide phosphohydrolase* [LNP] $1e^{-12}$, Atapy1 $3e^{-12}$, bzw. LNP $1e^{-10}$). Eine Aktivierung der Genexpression durch chemische Resistenzinduktoren (s. Abb. 3.4, 3.5, 3.6) wurde für Apyrasen bisher nicht beschrieben. Außer durch DCINA und BTH wurde die Expression durch Applikation von JM induziert (s. Abb. 3.8), alle anderen Behandlungen hatten keinen deutlichen Effekt auf *Bci-9*. Die Tatsache, dass die Geninduktion nur durch relativ artifizielle Behandlungen wie Applikation synthetischer Induktoren, bzw. 'Floaten' auf JM erfolgte, könnte darauf hinweisen, dass die Apyrase an einem Entgiftungsvorgang beteiligt ist, der von Thomas *et al.* (2000) beschrieben wurde (s.o.). Es gibt Hinweise, dass BTH eine sogenannte *Safener*-Wirkung besitzt (Shaner *et al.* 2000). *Safener* sind Substanzen, die Kulturpflanzen durch Aktivierung von Detoxifizierungsmechanismen vor der schädigenden Wirkung von gleichzeitig oder nachfolgend applizierten Herbiziden schützen sollen (Gaillard *et al.* 1994). Herbizide wie die ACCase-Inhibitoren Clodinafop und Fenoxaprop-ethyl werden z.B. im Weizenanbau gegen Ackerfuchsschwanz in Kombination mit *Safenern* als Beize eingesetzt. Die induzierte Expression der Apyrase (*Bci-9*) nach BTH-Applikation könnte an der beobachteten *Safener*-Wirkung von BTH beteiligt sein. Eine Funktion in Signaltransduktionsprozessen wurde für zwei Apyrasen mit Ähnlichkeit zu *Bci-9* diskutiert, für LNP von *Dicholus biflorus* in der Symbiose mit Rhizobien, bzw. allgemein bei Oligosaccharidsignalwegen (Etzler *et al.* 1999) und für eine Apyrase von *Arabidopsis*. Diese Apyrase (Atapy1) bindet Calmodulin, so dass eine Beteiligung an Ca^{2+} -vermittelten Signalwegen denkbar wäre, bei denen Veränderungen der Gehalte an ATP, ADP oder anderer Nukleosidtri- oder -diphosphate eine Rolle spielen könnten (Steinebrunner *et al.* 2000). Die strikte Regulation von *Bci-9* durch chemische Induktoren könnte demnach auch ein Hinweis auf eine Rolle bei der Aktivierung des cIR-Signalweges sein. Dabei wäre die

Genexpression durch JM unspezifisch, da JM-Applikation nicht zur Resistenz gegenüber *Bgh* führt, oder Ausdruck einer Überschneidung zweier Signalwege.

4.2.11 PR-1b: *Pathogenesis-related protein 1b*

Hauptsächlich in Dikotylen gilt das pathogeninduzierbare PR-1 als verlässlicher Marker für den Status induziert resistenter Pflanzen, sowohl bei biotischer als auch bei chemischer Induktion (Bowling *et al.* 1994, Cao *et al.* 1998, Sticher *et al.* 1997, Weymann *et al.* 1995). Die biochemische Funktion der PR-1-Proteine ist unbekannt, aber es gibt deutliche Hinweise auf eine antifungale Aktivität (Bryngelsson *et al.* 1994, Rauscher *et al.* 1999). In Gerste wurden zwei basische PR-1-Homologe (HvPR-1a, HvPR-1b) identifiziert, die über 70 % identische Aminosäuren mit einem sauren PR-1 aus Mais besitzen, über 60 % identische Aminosäuren mit basischen PR-1 und an die 60 % mit sauren PR-1-Proteinen aus Tabak (Bryngelsson *et al.* 1994, Muradov *et al.* 1993). *HvPr-1*-Transkript akkumuliert stärker in inkompatiblen Interaktionen von Gerste mit dem Echten Gerstenmehltaupilz und anderen pilzlichen Pathogenen, kann durch SA, DCINA, JM, Ethylen und UV-Licht, jedoch nicht durch eine Wundverletzung induziert werden (Bryngelsson *et al.* 1994, Muradov *et al.* 1993). Das Gen für ein basisches PR-1 aus Tabak (PRB-1b) wurde u.a. auch als Pathogen (TMV)-, SA- und ethyleninduzierbar beschrieben (Sessa *et al.* 1995). In einer Vielzahl von Experimenten mit chemisch induzierten Gerstenpflanzen konnte jedoch keine verlässliche Korrelation von *Pr-1b*-Expression und Induzierter Resistenz hergestellt werden (AG Kogel, unveröffentlicht). Um mögliche Unterschiede in der Regulation der *Bci*-Gene und *Pr-1b* darzustellen, wurde *Pr-1b* in die Genexpressionanalysen mit einbezogen.

In dem differentiellen SSH-Ansatz wurde *Pr-1b* weder als differentiell exprimiertes Gen identifiziert (s. 3.2), noch war die Expression in der Kinetik durch DCINA induziert (s. Abb. 3.5). In der Untersuchung zur gewebespezifischen Expression nach BTH-Applikation ist zwar eine differentielle Induktion sichtbar (s. Abb. 3.6), in anderen Experimenten war die Expression jedoch stärker in Kontrollpflanzen aktiviert (nicht gezeigt). Gregersen *et al.* (1997) wiesen die Geninduktion von *Pr-1b* in der Epidermis und im Mesophyll in kompatibler und inkompatibler Interaktion mit *Bgh* nach (s. auch Abb. 3.22 C), wobei die Stärke der Expression jedoch nicht mit Resistenz korrelierte. Alle untersuchten Interaktionen von Gerste mit nekrotisierenden Pathogenen (*C. sativus*, Bakterien, Abb. 8.9, 8.10, 3.14), Nicht-Wirt-Pathogenen (*Bgt*, nicht gezeigt) und einem Schädling (*S. avenae*, s. Abb. 3.15) führten zur Akkumulation von *Pr-1b*-Transkript, unabhängig von erfolgreicher Abwehr oder Pathogenese. Dieses Induktionsmuster von *Pr-1b* in Gerste erfolgte in Übereinstimmung mit Ergebnissen von Vallélian-Bindschedler *et al.* (1998) nach Inokulation mit *Bgh*, *Bgt* und *P.s. pv. syringae*. Die Expression zweier basischer PR-1 aus Weizen (TaPR-1.1, TaPR-1.2) mit über 90 % identischen Aminosäuren zu HvPR-1b aus

Gerste wurde nur in der kompatiblen Interaktion von Weizen mit *Blumeria graminis* f.sp. *tritici* und nicht in der Nicht-Wirt-Pathogen Interaktion mit *Bgh* oder durch Resistenzinduktoren wie SA, DCINA und BTH aktiviert (Molina *et al.* 1999). Die basischen PR-1-Proteine der Monokotylen Gerste und Weizen scheinen demnach kein Marker für Chemisch Induzierte oder resistenzgenbedingte Resistenz zu sein, im Gegensatz zu den sauren PR-1-Proteinen aus Mais (Morris *et al.* 1998) und Dikotylen (s.o.). Die Repression der *Pr-1b*-Expression in Gerste durch spezifisches *gene silencing* mittels RNAi führte zwar zur erhöhten Anfälligkeit gegenüber *Bgh*, die Überexpression hatte jedoch keinen deutlich resistenzsteigernden Einfluss auf die Interaktion (Schultheiss, unveröffentlicht). Die Expression von *Pr-1b* wird durch eine Vielzahl abiotischer und biotischer Stresssituationen hervorgerufen, wobei eine Geninduktion auch durch Ethylen und Jasmonate bestätigt wurde (s. Abb. 3.8, 3.9, 3.10, Bryngelsson *et al.* 1994, Muradov *et al.* 1993), und könnte dabei in Kombination mit anderen Faktoren an Abwehrprozessen beteiligt sein.

4.3 ABSCHLIEßENDE BETRACHTUNG UND EINORDNUNG DER *BCI*-GENE

Zusammenfassend betrachtet wurden in dem differentiellen Ansatz Gene identifiziert, die z.T. in Gerste bislang nicht beschrieben worden waren (z.B. *Bci-4*, *Bci-9*) oder deren Induzierbarkeit durch chemische Resistenzinduktoren nicht bekannt war. Interessanterweise sind unter den *Bci*-Genen solche, die vor allem in Dikotylen der jasmonatinduzierten Wund- und Insektenresistenz zugeordnet werden, wie z.B. *Bci-2* (Thionin), *Bci-3* (vegetatives Speicherprotein) und *Bci-7* (Proteinaseinhibitor). Die Untersuchung verschiedener chemischer Induktoren führte zur Identifizierung von Schnittmengen der *Bci*-Geninduktion, die durch tatsächliche Überschneidungen der Signaltransduktionswege bedingt sein könnten (Abb. 4.3). Der Proteinaseinhibitor (*Bci-7*) wird durch alle Behandlungen (BTH, JM, Sorbit, Verwundung) und zusätzlich durch Ethylen induziert und stellt damit die zentrale Schnittmenge dar. Eine relativ große Überschneidung besteht bei der Applikation von BTH und JM, obwohl Jasmonat in chemisch induzierten Pflanzen nicht gebildet wird und nach Applikation keine Resistenz gegenüber *Bgh* hervorrufen kann (Kogel *et al.* 1995). Da JM-Applikation Seneszenzerscheinungen hervorrufen kann (s. 4.2.3, 4.2.9), könnte man aufgrund der ähnlichen Geninduktion über einen seneszenzinduzierenden Effekt der chemischen Resistenzinduktoren DCINA und BTH spekulieren. Da jedoch für zwei seneszenzspezifische Gerstengene (*SD10* und *SV40*, Karin Krupinska, Institut für Botanik, Universität Kiel, unveröffentlicht) in *Northern*-Analysen keine Expression nach BTH-Applikation nachgewiesen werden konnte (nicht gezeigt) und auch der Chlorophyllgehalt

in diesen Blättern sogar höher war als in den Kontrollen (nicht gezeigt), kann die Induktion der *Bci*-Gene infolge von Seneszenz wahrscheinlich ausgeschlossen werden.

Ebensowenig wie eine Verwundung der Blätter oder die Applikation von Abscisinsäure die Interaktion von Gerste mit *Bgh* beeinflussen konnte (s. 4.1), führten die Behandlungen nur zur Aktivierung der Expression eines Bruchteils der *Bci*-Gene (Abb. 4.3). Die Expressionsprofile nach JM-Applikation, Sorbitbehandlung und Verwundung unterscheiden sich klar voneinander und weisen damit darauf hin, dass die Behandlungen unterschiedliche Signalwege induzieren. Anders als in Dikotylen scheinen Verwundungs- und Jasmonatresponsivität in Bezug auf die *Bci*-Gene nur geringfügig zu überlappen (*Bci*-7).

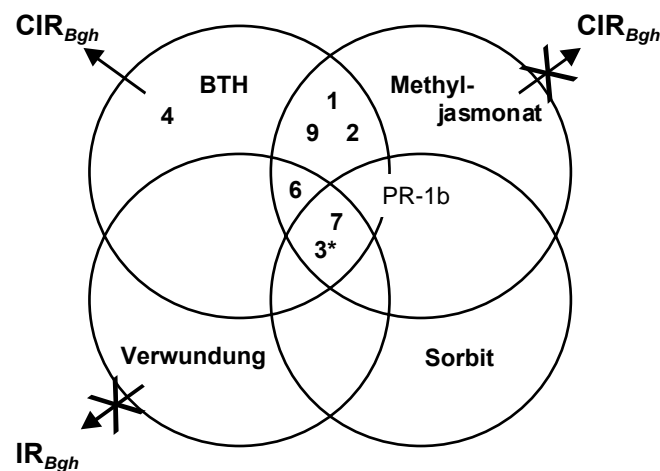


Abb. 4.3 Schnittmengen der *Bci*-Genexpression durch verschiedene Induktoren.

Die *Bci*-Gene (außer *Bci*-5 und *Bci*-8) wurden als Nummer jeweils nach ihrer Induzierbarkeit durch die als Kreis repräsentierten Behandlungen in das Schema eingeordnet. BTH: Applikation der Resistenzinduktoren BTH und DCINA. Methyljasmonat: 'Floaten' von Blattsegmenten auf JM. Sorbit: 'Floaten' von Blattsegmenten auf Sorbit, wobei der dadurch verursachte osmotische Stress zur Akkumulation von Jasmonaten und Abscisinsäure führt. Verwundung: Perforation von Blättern. cIR_{Bgh}/IR_{Bgh} : Chemisch Induzierte bzw. Induzierte Resistenz gegenüber *Bgh*. X: keine Resistenzinduktion. **Bci*-3 wurde durch exogenes JM induziert und durch endogen erhöhtes Jasmonat reprimiert. *Pr-1b* wurde durch BTH nicht verlässlich induziert und steht deshalb auf der Linie.

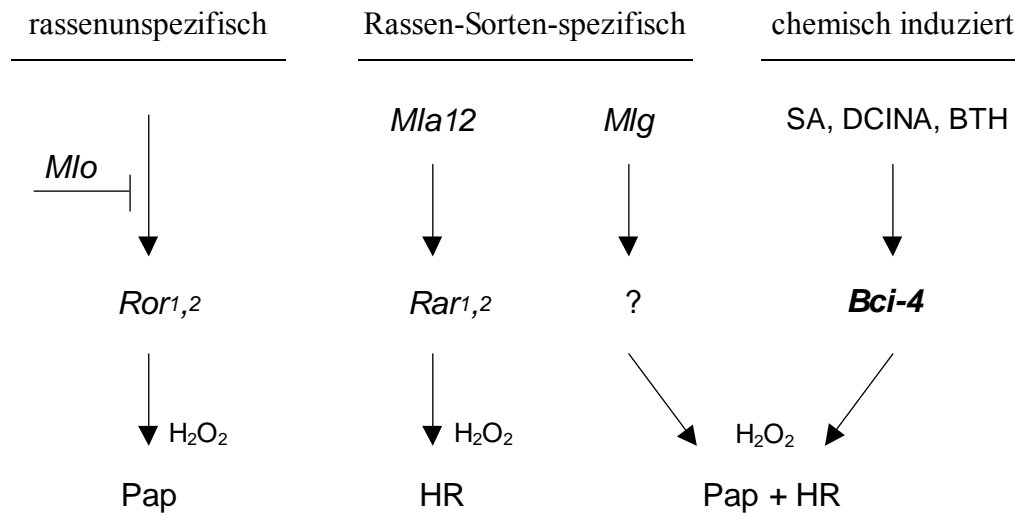
Die relativ schwache resistenzinduzierende Wirkung von SA im Vergleich zu den synthetischen Induktoren (s. 4.1) spiegelte sich in der schwächeren Genaktivierung nach SA-Applikation wider (Abb. 3.7, Abb. 3.19). Ein vergleichsweise geringer Teil der *Bci*-Gene wurde durch SA exprimiert (Tab. 3.3) und auch der endogene Anstieg des SA-Gehaltes z.B. durch Infiltration von Bakterien korrelierte nicht mit der Induktion der Gene (s. 4.1.; Abb. 3.14). Bei endogen erhöhtem SA-Gehalt wurden z.T. auch prinzipiell auf exogene SA-Applikation responsive Gene nicht oder nicht in Korrelation zur Höhe des SA-Gehaltes induziert. Neben der unter 4.1 diskutierten schnellen Inaktivierung von SA

könnten die Unterschiede zwischen exogener und endogener Wirkung die gleiche Ursache haben wie bereits für Jasmonat diskutiert (unterschiedliche Verfügbarkeit, Existenz oder Fehlen zusätzlicher Signale). Es wurde gezeigt, dass für die resistenzgenvermittelte Abwehr von avirulenten Pathogenen in Gerste keine SA-Akkumulation notwendig ist (Hückelhoven *et al.* 1999, Vallélian-Bindschedler *et al.* 1998), die Abwehr von Pathogenen durch cIR verläuft dagegen möglicherweise über einen SA-vermittelten Signalweg, dessen Komponenten teilweise durch einige der *Bci*-Gene repräsentiert sein könnten.

Keines der *Bci*-Gene wird bei der Interaktion mit *Bgh* induziert. Diese Unterschiede in der Induzierbarkeit von Genen bei chemisch induzierter Resistenz und durch Interaktion mit Pathogenen ausgelöster oder resistenzgenvermittelter Resistenz wurden schon für Weizen und Reis beschrieben (Görlach *et al.* 1996, Schaffrath *et al.* 1997, Schweizer *et al.* 1997). In Reis kann mit *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* systemisch Resistenz gegenüber *Magnaporthe grisea* induziert werden, wobei hauptsächlich andere Gene als bei der cIR gegenüber demselben Pathogen aktiviert werden (Schweizer *et al.* 1997). Während der cIR in Reis wird z.B. die Expression und Aktivität einer Lipoxxygenase (RCI-1) durch alle gegen *M. grisea* wirksamen chemischen Induktoren, aber nicht durch die Pathogene *M. grisea* und *P.s. syringae* induziert (Schaffrath *et al.* 2000). In Weizen wurden zwei Sets von Genen beschrieben, die entweder nach chemischer Induktion (*Wci*, *wheat chemically induced*) oder nach Pathogenbefall (*Wir*, *wheat induced resistance*) exprimiert werden (Görlach *et al.* 1996, Schaffrath *et al.* 1997). Das deutet auf die Existenz zumindest teilweise getrennter Signalwege der chemisch bzw. biotisch induzierten Resistenz in Gräsern hin, die für Dikotyle derart nicht beschrieben ist.

Die cIR scheint in Gerste zudem unabhängig von der Funktion von Resistenzgenen bzw. von Elementen, die für die resistenzgenvermittelte Resistenz notwendig sind, zu sein. Sowohl die chemische Induktion der Resistenz (s. 4.1.4) als auch die Expression von *Bci*-Genen war unabhängig vom Vorhandensein solcher Elemente gleichermaßen möglich. Die Induzierbarkeit der *Bci*-Genexpression wurde in resistenten *Mla12*- und *mlo5*-tragenden Gerstenlinien, in *rar*- und *ror*-Mutanten sowie in der Sorte Manchuria (kein bekanntes Resistenzgen, nicht gezeigt) nachgewiesen (s. 3.5, 3.6, 3.19; Jarosch, Dissertation in Vorbereitung, Schiffer 1998, Langen *et al.*, in Vorbereitung).

Für Gerste kann demnach die Existenz verschiedener Signalwege für die resistenzgenvermittelten Resistenzen und die cIR postuliert werden (Abb. 4.4). Dabei sind die effektiven Abwehrmechanismen, die am Ende der Signalwege zur Resistenz gegenüber *Bgh* führen, cytologisch gesehen ähnliche oder sogar die gleichen (Papillenbildung und/oder HR) und jeweils mit der Akkumulation von Wasserstoffperoxid assoziiert (Hückelhoven *et al.* 1999, 2000a, 2000b).



Resistenz gegenüber *Blumeria graminis* f.sp. *hordei*

Abb. 4.4 Modell der Resistenzwege in Gerste.

Vollständige rassenunspezifische Resistenz wird bei Verlust der *Mlo*-Funktion (*mlo*) ausgeprägt. *Mlo* ist ein negativer Regulator von Abwehrreaktionen, die abhängig von *Ror*-Elementen sind. Für die *Mla12*-vermittelte Rassen-Sorten-spezifische Resistenz werden *Rar*-Elemente benötigt. Für die *Mlg*-vermittelte Resistenz sind bislang keine weiteren benötigten Elemente bekannt. Für den cIR-Signalweg werden *Bci-4* und andere *Bci*-Gene als essentielle Komponenten postuliert. Unabhängig von den Resistenzwegen sind Papillenbildung (Pap) und/oder HR in Assoziation mit H_2O_2 -Bildung effektive Mechanismen zur Abwehr von *Bgh*. Dabei stellt die Abwehr in chemisch induzierten Pflanzen eine Phänokopie der *Mlg*-vermittelten Resistenzreaktion dar, ohne dass die zu Grunde liegenden Signalwege identisch sind. In der Abbildung sind die unspezifischen und spezifischen Auslöser der jeweiligen Resistenzwege nicht dargestellt.

Der Nachweis der Aktivierung von *Bci*-Genhomologen in Weizen ist ein weiterer Hinweis auf einen gemeinsamen cIR-Mechanismus in Monokotylen und könnte die Nutzung der *Bci*-Gene (*Bci-1*, *Bci-3*, *Bci-4* und *Bci-7*) als Marker für Induzierte Resistenz in Getreide ermöglichen. Während der SAR-Marker PR-1 für dikotylen Wirt-Pathogen-Interaktionen in Gerste nicht als verlässlich angesehen werden kann und durch eine Vielzahl von Signalen induziert wird (s. Tab. 3.3), erfüllt *Bci-4* die Voraussetzungen für einen geeigneten cIR-Marker.

In stabil transgenen Gerstenpflanzen sollte zunächst der Mechanismus, der der Resistenz durch *Bci-4*-Überexpression zugrunde liegt aufgeklärt und Veränderungen des Stoffwechsels untersucht werden. Ob transgene Gerstenpflanzen, die *Bci-4* überexprimieren, auch für den Feldanbau geeignet sein könnten, müssen weitere Untersuchungen mit stabil Transgenen zeigen.

Solange in Gerste kein verlässliches System beschrieben ist, in dem die sIR biotisch ausgelöst werden kann, bleibt unklar, ob die cIR ein natürliches Phänomen widerspiegelt.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Applikation von Salicylsäure (SA) und den synthetischen Analoga 2,6-Dichlorisonikotinsäure (DCINA) und Benzo(1,2,3)thiadiazol-7-carbothionsäure-S-methylester (BTH) führt in anfälligen Gerstensorten zu einem systemischen Schutz vor einer Infektion mit dem Erreger des Echten Gerstenmehltaus (*Blumeria graminis* f.sp. *hordei*, *Bgh*). Bei dieser chemisch induzierten Resistenz (cIR) werden effektive Papillen und eine Hypersensitive Reaktion als Abwehrmechanismen nach Kontakt mit dem Pathogen verstärkt gebildet.

In dieser Arbeit wurden verschiedene chemische und biotische Faktoren auf ihre resistenzinduzierende Wirkung überprüft. Es zeigte sich, dass die chemische Resistenzinduktion in der anfälligen Gerstensorte Manchuria, die kein bekanntes Resistenzgen besitzt, wirksam ist. Eine biotische Induktion der Resistenz gegenüber *Bgh* durch den avirulenten Echten Weizenmehltaupilz war dagegen in Manchuria nicht möglich.

In einer molekularbiologischen Analyse der cIR wurden durch Suppressive Subtraktionshybridisierung Gene identifiziert, die nach Applikation chemischer Resistenzinduktoren differentiell exprimiert werden. Einige dieser *Bci*-Gene (*barley chemically induced*) waren in Gerste bereits als durch DCINA induzierbar bekannt, wie Lipoxygenase (*Bci-1*) und Thionin (*Bci-2*). Andere waren in Gerste bislang unbekannt und zeigen Homologie zu sauren Phosphatasen (*Bci-3*, *Bci-6*), zu Ca^{2+} -bindenden *single EF-hand*-Proteinen (*Bci-4*), zu Serin-Proteinaseinhibitoren (*Bci-7*) und zu Apyrasen (*Bci-9*).

Die Überprüfung der Geninduktion durch verschiedene abiotische und biotische Faktoren wie Phytohormone, Verwundung und Pathogene wurde zur Charakterisierung der Gene eingesetzt. Es stellte sich heraus, dass einige der *Bci*-Gene über verschiedene Signalwege der Pflanze induzierbar sind. In Übereinstimmung mit der im Vergleich zu BTH und DCINA schwächeren Resistenzinduktion gegenüber *Bgh* durch SA zeigte sich, dass auch die Induktion der *Bci*-Genexpression und insbesondere die von *Bci-4* nach SA-Applikation schwächer war. Homologe von *Bci-4* und anderen *Bci*-Genen waren in Weizen nachweisbar und dort ebenfalls chemisch induzierbar.

Die Ergebnisse der Geninduktionsanalysen weisen darauf hin, dass sich besonders BCI-4 für den Einsatz als verlässlicher Marker der cIR in Getreide eignet. Ein BCI-4-Fusionsprotein mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) als Reporter wurde in intakten Zwiebelepidermiszellen überexprimiert, wobei die subzelluläre Verteilung der GFP-Fluoreszenz auf eine Lokalisierung von BCI-4 im ER hindeutet. In einer Funktionsanalyse von BCI-4 konnte die Überexpression in Epidermiszellen anfälliger Gerstensorten die Resistenz gegenüber *Bgh* erhöhen. Damit stellt BCI-4 möglicherweise ein regulatorisches Element des Signaltransduktionsweges der cIR dar, das ausreicht, um Gerstenzellen in einen erhöhten Resistenzzustand zu versetzen.

6 SUMMARY

Application of salicylic acid (SA) and its synthetic mimicks 2,6-dichloroisonicotinic acid (DCINA) and benzo(1,2,3)thiadiazole-7-carbothioic acid *S*-methyl ester (BTH) protect susceptible barley plants systemically against infection with the powdery mildew fungus (*Blumeria graminis* f.sp. *hordei*, *Bgh*). Expression of chemically Induced Resistance (cIR) is associated with plant defense mechanisms that result in effective papilla formation and a hypersensitive response upon contact with the pathogen.

In this study, different chemical and biotic factors were tested for their resistance inducing capacity. It was shown that chemical induction of resistance is efficient in Manchuria, though the cultivar does not bear any known resistance gene. In contrast, biotically Induced Resistance against *Bgh* with the non-host pathogen wheat powdery mildew fungus was not effective.

Molecular analysis of cIR in barley using suppressive subtraction hybridisation led to identification of genes that were differentially expressed upon application of chemical resistance inducers. Some of these *Bci* genes (barley chemically induced) coding for a lipoxygenase (*Bci-1*) and a thionin (*Bci-2*) were already known to be DCINA inducible, whereas others are newly described here. They show homology to genes of acid phosphatases (*Bci-3* and *Bci-6*), Ca²⁺ binding single EF-hand proteins (*Bci-4*), serine proteinase inhibitors (*Bci-7*) and apyrases (*Bci-9*).

Analyses of *Bci* gene expression profiles upon contact with various abiotic and biotic factors like phytohormones, wounding and pathogens were used to characterize these genes in more detail. Some of them were inducible through different signaling pathways of the plant. Compared with DCINA and BTH, SA was shown to be a weak inducer of resistance against *Bgh*. This is in accordance with the weak induction of gene expression especially regarding *Bci-4*.

The results of gene induction analyses indicate that BCI-4 might be useful as marker for cIR in cereals. A BCI-4 fusion with green fluorescent protein (GFP) as reporter was overexpressed in onion epidermal cells. The subcellular distribution of GFP fluorescence seemed to be associated with the ER. In a functional gene analysis, resistance against *Bgh* was enhanced in susceptible barley by overexpressing *Bci-4* in epidermal cells. Thus, BCI-4 might be a regulatory element of the signal transduction pathway leading to cIR in barley that is sufficient to mediate an enhanced resistance status of the plants.

7 LITERATUR

- Agrios, G.N. (1997) Plant Pathology. 4th edition, Academic Press, San Diego, USA.
- Ahlemeyer, J., Pons-Kühnemann, J. and Köhler, W. (2001) Effects of Chemical Induced Resistance on susceptibility of different barley varieties to powdery mildew. International workshop: Durable resistance in cereals. SAR and other strategies to improve plant production. Rauischholzhausen 2001, 43.
- Altschul S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25, 3389-3402.
- Andresen, I., Becker, W., Schlüter, K., Burges, J., Parthier, B. and Apel, K. (1992) The identification of leaf thionin as one of the main jasmonate-induced proteins of barley (*Hordeum vulgare*). Plant Mol. Biol. 19, 193-204.
- Beck, J.L., Durack, M.C., Hamilton, S.E. and de Jersey, J. (1999) Irreversible inactivation of purple acid phosphatase by hydrogen peroxide and ascorbate. J. Inorg. Biochem. 73 (4), 245-252.
- Berger, S., Bell, E., Sadka, A. and Mullet, J.E. (1995) *Arabidopsis thaliana* Atvsp is homologous to soybean VspA and VspB, genes encoding vegetative storage protein acid phosphatases, and is regulated similarly by methyl jasmonate, wounding, sugars, light and phosphate. Plant Mol. Biol. 27 (5), 933-942.
- Beßer, K., Jarosch, B., Langen, G. and Kogel, K.-H. (2000) Expression analysis of genes induced in barley after chemical activation reveals distinct disease resistance pathways. Molecular Plant Pathology 1(5), 277-286.
- Blumwald, E., Aharon, G.S. and Lam, B.C.-H. (1998) Early signal transduction pathways in plant-pathogen interactions. Trends Plant Science 3 (9), 342-346.
- Bohlmann, H., Clausen, S., Behnke, S., Giese, H., Hiller, C., Reimann-Philipp, U., Schrader, G., Barkholt, V. and Apel, K. (1988) Leaf-specific thionins of barley - a novel class of cell wall proteins toxic to plant-pathogenic fungi and possibly involved in the defence mechanism of plants. EMBO Journal 7 (6), 1559-1565.
- Bohlmann, H., Vignutelli, A., Hilpert, B., Miersch, O., Wasternack, C. and Apel, K. (1998) Wounding and chemicals induce expression of the *Arabidopsis thaliana* gene *Thi2.1*, encoding a fungal defense thionin, via the octadecanoid pathway. FEBS Letters 437, 281-286.
- Bonas, U. and van den Ackerveken, G. (1999) Gene-for-gene interactions: bacterial avirulence proteins specify plant disease resistance. Curr. Opinion Microbiol. 2, 94-98.
- Bostock, R.M. (1999) Signal conflicts and synergies in induced resistance to multiple attackers. Physiol. Mol. Plant Pathol. 55, 99-109.
- Bowling, S.A., Clarke, J.D., Liu, Yidong, Klessig, D.F. and Dong, X. (1997) The *cpr5* mutant of *Arabidopsis* expresses both NPR1-dependent and NPR1-independent resistance. Plant Cell 9, 1573-1584.
- Bowling, S.A., Guo, A., Cao, H., Gordon, A.S., Klessig, D.F. and Dong, X. (1994) A mutation in *Arabidopsis* that leads to constitutive expression of Systemic Acquired Resistance. Plant Cell 6, 1845-1857.

- Boyd, L.A., Smith, P.H., Green, R.M. and Brown, J.K.M. (1994) The relationship between the expression of defense-related genes and mildew development in barley. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 7 (3), 401-410.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brandt, J., Thordal-Christensen, H., Vad, K., Gregersen, P.L. and Collinge, D.B. (1992a) A pathogen-induced gene of barley encodes a protein showing high similarity to a protein kinase regulator. *Plant J.* 2(5), 815-820.
- Brandt, J., Nielsen, V.S., Thordal-Christensen, H., Simpson, D.J. and Okkels, J.S. (1992b) A barley cDNA clone encoding a type III chlorophyll a/b-binding polypeptide of the light-harvesting complex II. *Plant Mol. Biol.* 19 (4), 699-703.
- Breton, G., Vazquez-Tello, A., Danyluk, J. and Sarhan, F. (2000) Two novel intrinsic annexins accumulate in wheat membranes in response to low temperature. *Plant Cell Physiol.* 41 (2), 177-184.
- Broekaert, W.F., Terras, F.R.G., Cammue, B.P.A., Osborn, R.W. (1995) Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. *Plant Physiol.* 108, 1353-1358.
- Bryngelsson, T., Sommer-Knudsen, J., Gregersen, P.L., Collinge, D.B., Ek, B. and Thordal-Christensen, H. (1994) Purification, characterization, and molecular cloning of basic PR-1-type pathogenesis-related proteins from barley. *Mol. Plant Microbe Interact.* 7, 267-275.
- Büsches, R., Hollricher, K., Panstruga, R., Simons, G., Wolter, M., Frijters, A., van Daelen, R., van der Lee, T., Diergaarde, P., Groenendijk, J., Töpsch, S., Vos, P., Salamini, F. and Schulze-Lefert, P. (1997) The barley *Mlo* gene: a novel control element of plant pathogen resistance. *Cell* 88, 695-705.
- Bushnell, W.R. and Gay, J. (1978) Accumulation of solutes in relation to the structure and function of haustoria in powdery mildew. In: *The powdery mildew*. Spencer, D.M. ed., Academic Press London, UK, 183-235.
- Camoni, L., Harper, J.F. and Palmgren, M.G. (1998) 14-3-3 proteins activate a plant calcium-dependent protein kinase (CDPK). *FEBS Letters* 430, 381-384.
- Cao, H., Bowling, S.A., Gordon, S. and Dong, X. (1994) Characterization of an *Arabidopsis* mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance. *Plant Cell* 6, 1583-1592.
- Cao, H., Glazebrook, J., Clarke, J.D., Volko, S. and Dong, X. (1997) The *Arabidopsis NPR1* gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell* 88, 57-63.
- Cao, H., Li, X. and Dong, X. (1998) Generation of broad-spectrum disease resistance by overexpression of an essential regulatory gene in systemic acquired resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 6531-6536.
- Carmona, M.J., Molina, A., Fernández, J.A., López-Fando, J.J. and García-Olmedo, F. (1993) Expression of the α -thionin gene from barley in tobacco confers enhanced resistance to bacterial pathogens. *Plant J.* 3 (3), 457-462.
- Carver, T.L.W., Lyngkjær, M.F., Neyron, L. and Strudwicke, C.C. (1999) Induction of cellular accessibility and inaccessibility and suppression and potentiation of cell death in oat attacked by *Blumeria graminis* f.sp. *avenae*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 55 (3), 183-196.

- Chaudhry, B., Muller-Uri, F., Cameron-Mills, V., Gough, S., Simpson, D., Skriver, K. and Mundy, J. (1994) The barley 60 kDa jasmonate-induced protein (JIP60) is a novel ribosome-inactivating protein. *Plant Journal* 6 (6), 815-824.
- Chen, J.C.F., Tsai, C.C.Y. and Tzen, J.T.C. (1999) Cloning and secondary structure analysis of caleosin, a unique calcium-binding protein in oil bodies of plant seeds. *Plant Cell Physiol.* 40 (10), 1079-1086.
- Chevalier, C., Bourgeois, E., Pradet, A. and Raymond, P. (1995) Molecular cloning and characterization of six cDNAs expressed during glucose starvation in excised maize (*Zea mays* L.) root tips. *Plant Mol. Biol.* 28 (3), 473-485.
- Cho, B.H. and Smedegård-Petersen, V. (1986) Induction of resistance to *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei* in near-isogenic barley lines. *Phytopathology* 76, 301-305.
- Chow, T., Hsu, T., Tsai, F. and Hsing, Y.C. (1997) A soybean seed maturation protein GmPM13 (Accession No. AF004809) is a calcium-binding protein (PGR97-111). *Plant Physiol.* 114, 1568.
- Cohn, J., Sessa, G. and Martin, G.B. (2001) Innate immunity in plants. *Curr. Opinion Immunol.* 13, 55-62.
- Conrath, U, Thulke, O., Katz, V., Schwindling, S. and Kohler, A. (2001) Priming as a mechanism in induced systemic resistance in plants. *Europ. J. Plant Pathol.* 107, 113-119.
- Cordero, M.J., Raventos, D. and San Segundo, B. (1994) Expression of a maize proteinase inhibitor gene is induced in response to wounding and fungal infection: systemic wound-response of a monocot gene. *Plant J.* 6 (2), 141-150.
- Creelmann, R.A. & Mullet, J.E. (1997a) Oligosaccharides, brassinolides, and jasmonates; nontraditional regulators of plant growth, development, and gene expression. *Plant Cell* 9, 1211-1223.
- Creelmann, R.A. & Mullet, J.E. (1997b) Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 48, 355-381.
- Day, R.B., McAlvin, C.B., Loh, J.T., Denny, R.L., Wood, T.C., Young, N.D. and Stacey, G. (2000) Differential expression of two soybean apyrases, one of which is an early nodulin. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13 (10), 1053-1070.
- de Carvalho Niebel, F., Lescure, N., Cullimore, J.V. and Gamas, P. (1998) The *Medicago truncatula* MtAnn1 gene encoding an annexin is induced by Nod factors and during the symbiotic interaction with *Rhizobium meliloti*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11 (6), 504-513.
- Delaney, T.P. (1997) Genetic dissection of Acquired Resistance to disease. *Plant Physiol.* 113, 5-12.
- Delaney, T.P. (2000) New mutants provide clues into regulation of systemic acquired resistance. *Trends Plant Sci.* 5 (2), 49-51.
- Delaney, T.P., Friedrich, L. and Ryals, J.A. (1995) *Arabidopsis* signal transduction mutant defective in chemically and biologically induced disease resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 6602-6606.
- Delaney, T.P., Uknes, S., Vernooij, B., Friedrich, L., Weymann, K., Negrotto, D., Gaffney, T., Gut-Rella, M., Kessmann, H., Ward, E. and Ryals, J. (1994) A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science* 266, 1247-1250.
- del Pozo, J.C., Allona, I., Rubio, V., Leyva, A., de la Pena, A., Aragoncillo, C. and Paz-Ares, J. (1999) A type 5 acid phosphatase gene from *Arabidopsis thaliana* is induced by phosphate

- starvation and by some other types of phosphate mobilising/oxidative stress conditions. *Plant J.* 19 (5), 579-589.
- Després, C., De Long, C., Glaze, S., Liu, E. and Fobert, P.R. (2000) The *Arabidopsis* NPR1/NIM1 protein enhances the DNA binding activity of a subgroup of the TGA family of bZIP transcription factors. *Plant Cell* 12, 279-290.
- de Wald, D.B., Mason, H.S. and Mullet, J.E. (1992) The soybean vegetative storage proteins VSP alpha and VSP beta are acid phosphatases active on polyphosphates. *J. Biol. Chem.* 267 (22), 15958-15964.
- de Wit, P.J.G.M. (1997) Pathogen avirulence and plant resistance: a key role for recognition. *Trends Plant Science* 2 (12), 452-458.
- de Wit, P.J.G.M. and Joosten, M.H.A.J. (1999) Avirulence and resistance genes in the *Cladosporium fulvum*-tomato interaction. *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 368-373.
- Diatchenko, L., Lau, Y.F., Campbell, A.P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E.D. and Siebert, P.D. (1996) Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 6025-30.
- Doke, N., Miura, Y., Sanchez, L.M. and Kawakita, K. (1994) Involvement of superoxide in signal transduction: responses to attack by pathogens, physical and chemical shocks, and UV irradiation. In: Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants. Foyer & Mullineaux, eds., CRC Press, London, UK.
- Dresselhaus, T., Barcelo, P., Hagel, C., Lorz, H. and Humbeck, K. (1996) Isolation and characterization of a *Tritordeum* cDNA encoding S-adenosylmethionine decarboxylase that is circadian-clock-regulated. *Plant Mol. Biol.* 30 (5), 1021-1033.
- Dudler, R., Hertig, C., Rebmann, G., Bull, J. and Mauch, F. (1991) A pathogen-induced wheat gene encodes a protein homologous to glutathione-S-transferases. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 4, 14-18.
- Duff, S.M.G., Sarath, G. and Plaxton, W.C. (1994) The role of acid phosphatases in plant phosphorus metabolism. *Physiologia Plantarum* 90, 791-800.
- Ebrahim-Nesbat, F., Behnke, S., Kleinhofs, A. and Apel, K. (1989) Cultivar-related differences in the distribution of cell-wall-bound thionins in compatible and incompatible interactions between barley and powdery mildew. *Planta* 179, 203-210.
- Ebrahim-Nesbat, F., Bohl, S., Heitefuss, R. and Apel, K. (1993) Thionin in cell walls and papillae of barley in compatible and incompatible interactions with *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 43, 343-352.
- Ellingboe, A.H. (1972) Genetics and physiology of primary infection by *Erysiphe graminis*. *Phytopathology* 62, 401-406.
- English, J., Bonner, J. and Haagen-Smit, A.J. (1939) Structure and synthesis of a plant wound hormone. *Science* 90, 329.
- Enyedi, A.J. and Raskin, I. (1993) Induction of UDP-glucose: salicylic acid glucosyl-transferase activity in tobacco mosaic virus-inoculated tobacco (*Nicotiana tabacum*) leaves. *Plant Physiol.* 101, 1375-1380.
- Enyedi, A.J., Yalpani, N., Silverman, P. and Raskin, I. (1992a) Signal molecules in systemic plant resistance to pathogens and pests. *Cell* 70, 879-886.

- Enyed, A.J., Yalpani, N., Silverman, P. and Raskin, I. (1992b) Localization, conjugation and function of salicylic acid in tobacco during the hypersensitive reaction in tobacco mosaic virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 2480-2484.
- Epple, P., Apel, K. and Bohlmann, H. (1997) Overexpression of an endogenous thionin enhances resistance of *Arabidopsis* against *Fusarium oxysporum*. *Plant Cell* 9, 509-520.
- Etzler, M.E., Kalsi, G., Ewing, N.N., Roberts, N.J., Day, R.B. and Murphey, J.B. (1999) A nod factor binding lectin with apyrase activity from legume roots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 5856-5861.
- Farmer, E.E., Johnson, R.R. and Ryan, C.A. (1992) Regulation of expression of proteinase inhibitor genes by methyl jasmonate and jasmonic acid. *Plant Physiol.* 98, 995-1002.
- Farmer, E.E. and Ryan, C.A. (1992) Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *Plant Cell* 4, 129-134.
- Felton, G.W., Bi, J.L., Mathews, M.C., Murphy, J.B., Korth, K., Wesley, S.V., Lamb, C. and Dixon, R.A. (1999) Cross-talk between the signal pathways for pathogen-induced systemic acquired resistance and grazing-induced insect resistance. *Novartis Found Symp.* 223, 166-174.
- Feussner, I., Fritz, I.G., Hause, B., Ullrich, W.R. and Wasternack, C. (1997) Induction of a new lipoxygenase form in cucumber leaves by salicylic acid or 2,6-dichloroisonicotinic acid. *Bot. Acta* 110, 101-108.
- Feussner, I., Hause, B., Vörös, K., Parthier, B. and Wasternack, C. (1995) Jasmonate-induced lipoxygenase forms are localized in chloroplasts of barley leaves (*Hordeum vulgare* cv. Salome). *Plant Journal* 7 (6), 949-957.
- Feys, B.J. and Parker, J.E. (2000) Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. *Trends Genet.* 16 (10), 449-55
- Finnie, C., Borch, J. and Collinge, D.B. (1999) 14-3-3 proteins: eukaryotic regulatory proteins with many functions. *Plant Mol. Biol.* 40, 545-554.
- Flor, H.H. (1971) Current status of the gene for gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* 9, 275-296.
- Frandsen, G., Müller-Uri, F., Nielsen, M., Mundy, J. and Skriver, K. (1996) Novel plant Ca^{2+} -binding protein expressed in response to abscisic acid and osmotic stress. *J. Biol. Chem.* 271, 343-348.
- Franke, W. (1989) *Nutzpflanzenkunde*. 4. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Freialdenhoven, A., Peterhänsel, C., Kurth, J., Kreuzaler, F. and Schulze-Lefert, P. (1996) Identification of genes required for the function of non-race-specific mlo resistance to powdery mildew in barley. *Plant Cell* 8, 5-14.
- Freialdenhoven, A., Scherag, B., Hollricher, K., Collinge, D.B., Thordal-Christensen, H. and Schulze-Lefert, P. (1994) *Nar-1* and *Nar-2*, two loci required for *Mla12*-specified race-specific resistance to powdery mildew in barley. *Plant Cell* 6, 983-994.
- Friedrich, L., Lawton, K., Ruess, W., Masner, P., Specker, N., Gut-Rella, M., Meier, B., Dincher, S., Staub, T., Ukness, S., Métraux, J.-P., Kessmann, H. and Ryals, J. (1996) A benzothiadiazole derivative induces systemic acquired resistance in tobacco. *Plant J.* 10 (1), 61-70.
- Gadea, J., Mayda, M.E., Conejero, V. and Vera, P. (1996) Characterization of defense-related genes ectopically expressed in viroid-infected tomato plants. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 9 (5), 409-415.
- Gäumann, E.A. (1926) *Vergleichende Morphologie der Pilze*. Gustav Fischer Verlag, Jena.

- Gaffney, T., Friedrich, L., Vernooij, B., Negrotto, D., Nye, G., Uknes, S., Ward, E., Kessmann, H. and Ryals, J. (1993) Requirements of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science* 261, 754-756.
- Gaillard, C., Dufaud, A., Tommasini, R., Kreuz, K., Amrhein, N. and Martinoia, E. (1994) A herbicide antidote (safener) induces the activity of both the herbicide detoxifying enzyme and of a vacuolar transporter for the detoxified herbicide. *FEBS Letters* 352 (2), 219-221.
- Gausling, K. (1987) Thionin genes specifically expressed in barley leaves. *Planta* 171, 241-246.
- Gernns, H. and von Alten H. (1996) Modification of plasma membrane of barley leaves by resistance induction: I. Fatty acid patterns. *Z. Pflanzenkrankh. Pflanzensch.* 103 (6), 590-595.
- Gessler, C. and Kuć, J. (1982) Induction of resistance to *Fusarium* wilt in cucumber by root and foliar pathogens. *Phytopathology* 72, 1439-1441.
- Giderol, X., Sabelli, P.A., Fern, Y.S. and Kush, A.K. (1996) Annexin-like protein from *Arabidopsis thaliana* rescues *ΔoxyR* mutant of *Escherichia coli* from H₂O₂ stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 11268-11273.
- Görg, R., Hollricher, K. and Schulze-Lefert, P. (1993) Functional analysis and RFLP-mediated mapping of the *Mlg* resistance locus in barley. *Plant Journal* 3 (6), 857-866.
- Görlach, J., Volrath, S., Knauf-Beiter, G., Hengy, G., Beckhove, U., Kogel, K.H., Oostendorp, M., Staub, T., Ward, E., Kessmann, H. and Ryals, J. (1996) Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *Plant Cell* 8, 629-643.
- Gregersen, P.L., Thordal-Christensen, H., Förster, H. and Collinge, D.B. (1997) Differential gene transcript accumulation in barley leaf epidermis and mesophyll in response to attack by *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* (syn. *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*). *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 51, 85-97.
- Gupta, V., Willits, M.G. and Glazebrook, J. (2000) *Arabidopsis thaliana* *EDS4* contributes to salicylic acid (SA)-dependent expression of defense responses: evidence for inhibition of jasmonic acid signaling by SA. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13 (5), 503-511.
- Hagborg, W.A.F. (1970) A device for injecting solutions and suspensions into thin leaves of plants. *Can J. Bot.* 48, 1135-1136.
- Hammerschmidt, R. (1993) The nature and generation of systemic signals induced by pathogens, arthropod herbivores, and wounds. In: *Advances in plant pathology*. Vol. 10, 307-337.
- Hammond-Kosack, K.E. and Jones, J.D.G. (1996) Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* 8 (10), 1773-1791.
- Hause, B., Hertel, S.C., Klaus, D. and Wasternack, C. (1999a) Cultivar-specific expression of the jasmonate-induced protein of 23 kDa (JIP-23) occurs in *Hordeum vulgare* L. by jasmonates but not during seed germination. *Plant Biology* 1 (1), 83-89.
- Hause, B., Vörös, K., Kogel, K.-H., Beßer, K. and Wasternack, C. (1999b) A jasmonate-responsive lipoxygenase of barley leaves is induced by plant activators but not by pathogens.
- Heath, M.C. (1991) The role of gene-for-gene interactions in the determination of host species specificity. *Phytopathology* 81 (2), 127-130.
- Heath, M.C. (2000) Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Curr. Op. Plant Biol.* 3, 315-319.
- Hildebrand, D.F. (1989) Lipoxygenases. *Physiol. Plantarum* 76, 249-253.

- Hock, B. and Elstner, E.F. (1995) Schadwirkungen auf Pflanzen. Lehrbuch der Pflanzentoxikologie. 3. Edition, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Hoffland, E., Pieterse, C.M.J., Bik, L. and van Pelt, J.A. (1995) Induced systemic resistance in radish is not associated with accumulation of pathogenesis-related proteins. *Phys. Mol. Plant Pathol.* 46, 309-320.
- Hoffmann, G.M. and Schmutterer, H. (1999) Parasitäre Krankheiten und Schädlinge an landwirtschaftlichen Kulturpflanzen. 2. ed., Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart.
- Horiguchi, G., Iwakawa, H., Kodama, H., Kawakami, N., Nishimura, M. and Iba, K. (1996) Expression of a gene for plastid omega-3 fatty acid desaturase and changes in lipid and fatty acid compositions in light- and dark-grown wheat leaves. *Physiol. Plantarum* 96, 275-283.
- Horiguchi, G., Kawakami, N., Kusumi, K., Kodama, H. and Iba, K. (1998) Developmental regulation of genes for microsome and plastid omega-3 fatty acid desaturases in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Physiol.* 39 (5), 540-544.
- Hückelhoven, R. (1999) Untersuchungen zur Rolle reaktiver Sauerstoffintermediate in der Resistenz der Gerste gegenüber dem Echten Gerstenmehltaupilz. Dissertation JLU Gießen.
- Hückelhoven, R., Fodor, J., Preis, C. and Kogel, K.-H. (1999) Hypersensitive cell death and papilla formation in barley attacked by the powdery mildew fungus are associated with hydrogen peroxide but not with salicylic acid accumulation. *Plant Physiology* 119, 1251-1260.
- Hückelhoven, R., Fodor, J., Trujillo, M., Kogel, K.-H. (2000a) Barley *Mla* and *Rar* mutants compromised in the hypersensitive cell death response against *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* are modified in their ability to accumulate reactive oxygen intermediates at sites of fungal invasion. *Planta* 212, 16-24.
- Hückelhoven, R., Trujillo, M. and Kogel, K.-H. (2000b) Mutations in *Ror1* and *Ror2* genes cause modification of hydrogen peroxide accumulation in *mlo*-barley under attack from the powdery mildew fungus. *Mol. Plant Pathol.* 1 (5), 287-292.
- Hunt, M.D., Delaney, T.P., Dietrich, R.A., Weymann, K.B., Dangl, J.L. and Ryals, J.A. (1997) Salicylate-independent lesion formation in *Arabidopsis* lsd mutants. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10 (5), 531-536.
- Hwang, B.K. and Heitefuss, R. (1982) Induced resistance of spring barley to *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*. *Phytopathol. Z.* 103, 41-47.
- Hwang, B.K., Sunwoo, J.Y., Kim, Y.J. and Kim, B.S. (1997) Accumulation of β -1,3-glucanase and chitinase isoforms, and salicylic acid in the DL- β -amino-n-butyric acid-induced resistance response of pepper stems to *Phytophthora capsici*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 51, 305-322.
- Ikura, M. (1996) Calcium binding and conformational response in EF-hand proteins. *Trends Biochem. Sci.* 21, 14-17.
- Jarosch, B., Beckhove, U., Schiffer, R., Heise, S., Kreuzaler, F. and Kogel, K.-H. (1997) A common basis of genetically based induced resistance in cereals. New approaches for the assessment of reliable assays for chemical inducers. In: Dehne, H.-W. et al. (eds.) *Diagnosis and identification of plant pathogens*, 229-235.
- Jia, Y., Mc Adams, S.A., Bryan, G.T., Hershey, H.P. and Valent, B. (2000) Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *EMBO J.* 19 (15), 4004-4015.
- Jørgensen, J.H. (1992) Discovery, characterization and exploitation of *Mlo* powdery mildew resistance in barley. *Euphytica* 63, 141-152.

- Jørgensen, J.H. (1994) Genetics of powdery mildew resistance in barley. *Critical Reviews Plant Science* 13 (1), 97-119.
- Jørgensen, J.H., Lübeck, P.S., Thordal-Christensen, H., de Neergård, E. and Smedegård-Petersen, V. (1998) Mechanisms of induced resistance in barley against *Drechslera teres*. *Phytopathology* 88, 698-707.
- Kauss, H. (1990) Role of the plasma membrane in host-pathogen interactions. In: The plant plasma membrane. Larsson, C. & Møller, I.M. eds., Springer Verlag, Berlin, 320-351.
- Kenton, P., Mur, L.A.J. and Draper, J. (1999) A requirement for calcium and protein phosphatase in the jasmonate-induced increase in tobacco leaf acid phosphatase specific activity. *J. Exp. Botany* 50 (337), 1331-1341.
- Kessmann, H., Staub, T., Hofmann, C., Martzke, T., Herzog, J., Ward, E.R., Uknes, S.J. and Ryals, J.A. (1994) Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. *Annu. Rev. Phytopathol.* 32, 439-459.
- Kirsch, C., Takamiya-Wik, M., Reinold, S., Hahlbrock, K. and Somssich, I.E. (1997) Rapid, transient, and highly localized induction of plastidial ω -3 fatty acid desaturase mRNA at fungal infection sites in *Petroselinum crispum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 2079-2084.
- Koga, H., Bushnell, W.R. and Zeyen, R.J. (1990) Specificity of cell type and timing of events associated with papilla formation and the hypersensitive reaction in leaves of *Hordeum vulgare* attacked by *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*. *Can. J. Bot.* 68, 2344-2352.
- Kogel, K.-H., Ortel, B., Jarosch, B., Atzorn, R., Schiffer, R. and Wasternack, C. (1995) Resistance in barley against the powdery mildew fungus (*Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*) is not associated with enhanced levels of endogenous jasmonates.
- Kogel, K.H., Beckhove, U., Dreschers, J., Münch, S. and Rommé, Y. (1994) Acquired resistance in barley. *Plant Physiol.* 106, 1269-1277.
- Koiwa, H., Bressan, R.A. and Hasegawa, P.M. (1997) Regulation of protease inhibitors and plant defense. *Trends Plant Science* 2 (10), 379-384.
- Kølster, P., Munk, L., Stølen, O. and Løhde, J. (1986) Near-isogenic barley lines with genes for resistance to powdery mildew. *Crop Sci.* 26, 903-907.
- Komosiński, M. and Wojtczak, A. (1996) Apyrases (ATP diphosphohydrolases, EC 3.6.1.5): function and relationship to ATPases. *Biochim. Biophys. Acta* 1310, 233-241.
- Komura, T., Kobayashi, I., Yamaoka, N. and Kunoh, H. (1990) Induced accessibility and enhanced inaccessibility at the cellular level in barley coleoptiles. VIII. Cytological evidence for suppressor(s) of host inaccessibility from *Erysiphe graminis*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 37, 409-416.
- Kovács, I., Ayaydin, F., Oberschall, A., Ipacs, I., Bottka, S., Pongor, S., Dudits, D. and Tóth, E.C. (1998) Immunolocalization of a novel annexin-like protein encoded by a stress and abscisic acid responsive gene in alfalfa. *Plant J.* 15 (2), 185-197.
- Kuč, J. (1995) Phytoalexins, stress metabolism, and disease resistance in plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 33, 275-297.
- Kumar, D. and Klessig, D.F. (2000) Differential induction of tobacco MAP kinases by the defense signals nitric oxide, salicylic acid, ethylene, and jasmonic acid. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13 (3), 347-351.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 227, 680.

- Lawton, K.A., Friedrich, L., Hunt, M., Weymann, K., Delaney, T., Kessmann, H., Staub, T. and Ryals, J. (1996) Bezothiadiazole induces disease resistance in *Arabidopsis* by activation of Systemic Acquired Resistance signal transduction pathway. *Plant J.*, 10 (1), 71-82.
- Lawton, K.A., Potter, S.L., Uknes, S. and Ryals, J. (1994) Acquired resistance signal transduction in *Arabidopsis* is ethylene independent. *Plant Cell* 6 (5), 581-588.
- Lee, J., Parthier, B. and Löbner, M. (1996) Jasmonate signalling can be uncoupled from abscisic acid signalling in barley: Identification of jasmonate-regulated transcripts which are not induced by abscisic acid. *Planta* 199 (4), 625-632.
- Lehmann, J., Atzorn, R., Brückner, C., Reinbothe, S., Leopold, J., Wasternack, C. and Parthier, B. (1995) Accumulation of jasmonate, abscisic acid, specific transcripts and proteins in osmotically stressed barley leaf segments. *Planta* 197, 156-162.
- Leister, R.T. and Katagiri, F. (2000) A resistance gene product of the nucleotide binding site-leucine rich repeats class can form a complex with bacterial avirulence proteins *in vivo*. *Plant J.* 22 (4), 345-354.
- Lewin, B. (1994) *Genes V*. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Li, Z.Y. and Chen, S.Y. (2000) Isolation and characterization of a salt and drought-inducible gene for S-adenosylmethionine decarboxylase from wheat (*Triticum aestivum* L.). *J. Plant Physiol.* 156, 386-393.
- Lim, E.-K., Roberts, M.R. and Bowles, D.J. (1998) Biochemical characterization of tomato annexin p35. *J. Biol. Chem.* 273 (52), 34920-34925.
- Liu, H., Trieu, A.T., Blaylock, L.A. and Harrison, M.J. (1998) Cloning and characterization of two phosphate transporters from *Medicago truncatula* roots: regulation in response to phosphate and to colonization by arbuscular mycorrhizal (AM) fungi. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11(1), 14-22.
- Liu, Y., Zhang, S. and Klessig, D.F. (2000) Molecular cloning and characterization of a tobacco MAP kinase that interacts with SIPK. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13 (1), 118-124.
- Löbner, M. and Lee, J. (1998) Jasmonate signalling in barley. *Trends Plant Sci.* 3 (1), 8-9.
- Longstaff, M., Raines, C.A., McMorro, E.M., Bradbeer, J.W. and Dyer, T.A. (1989) Wheat phosphoglycerate kinase: evidence for recombination between the genes for the chloroplastic and cytosolic enzymes. *Nucleic Acids Res.* 17 (16), 6569-6580.
- Luan, S. (1998) Protein phosphatases and signaling cascades in higher plants. *Trends Plant Sci.* 3, 271-275.
- Maleck, K. and Dietrich, R.A. (1999) Defense on multiple fronts: how do plants cope with diverse enemies? *Trends Plant Science* 4 (6), 215-219.
- Manninen, I. and Schulman, A.H. (1993) BARE-1, a copia-like retroelement in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Mol. Biol.* 22 (5), 829-846.
- May, T. and Soll, J. (2000) 14-3-3 proteins form a guidance complex with chloroplast precursor proteins in plants. *Plant Cell* 12, 53-64.
- McAinsh, M.R. and Hetherington, A.M. (1998) Encoding specificity in Ca^{2+} signalling systems. *Trends Plant Sci.* 3 (1), 32-36.
- Métraux, J.-P., Ahl-Goy, P., Staub, T., Speich, J., Steinemann, A., Ryals, J. and Ward, E. (1991) Induced systemic resistance in cucumber in response to 2,6-dichloro-isonicotinic acid and

- pathogens. In: *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions* Vol. 1. Hennecke, H. and Verma, D.P.S. (eds), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Niederlande, 432-439.
- Métraux, J.-P., Signer, H., Ryals, J., Ward, E., Wyss-Benz, M., Gaudin, J., Raschdorf, K., Schmid, E., Blum, W. and Inverardi, B. (1990) Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science* 250, 1004-1006.
- Michelis, R. and Gepstein, S. (2000) Identification and characterization of a heat-induced isoform of aldolase in oat chloroplast. *Plant Mol. Biol.* 44 (4), 487-498.
- Molina, A., Görlach, J., Volrath, S. and Ryals, J. (1999) Wheat genes encoding two types of PR-1 proteins are pathogen inducible, but do not respond to activators of systemic acquired resistance. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12 (1), 53-58.
- Moncrief, N.D., Kretsinger, R.H. and Goodman, M. (1990) Evolution of EF-hand calcium-modulated proteins. I. Relationships based on amino acid sequences. *J. Mol. Evol.* 30 (6), 522-562.
- Moran, P.J. and Thompson, G.A. (2001) Molecular responses to aphid feeding in *Arabidopsis* in relation to plant defense pathways. *Plant Physiol.* 125 (2), 1074-1085.
- Morris, S.W., Vernooij, B., Titatam, S., Starrett, M., Thomas, S., Wiltse, C.C., Frederiksen, R.A., Bhandhufalck, A., Hulbert, S. and Uknes, S. (1998) Induced resistance response in maize. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11, 643-658.
- Muradov, A., Petrasovits, L., Davidson, A. and Scott, K.J. (1993) A cDNA clone for a pathogenesis-related protein 1 from barley. *Plant Mol. Biol.* 23 (2), 439-442.
- Murphy, D.J., Hernandez-Pinzon, I., Patel, K., Hope, R.G. and McLauchlan, J. (2000) New insights into the mechanisms of lipid-body biogenesis in plants and other organisms. *Biochem. Society Transact.* 28 (6), 710-711.
- Næsted, H., Frandsen, G.I., Jauh, G.-Y., Hernandez-Pinzon, I., Nielsen, H.B., Murphy, D.J., Rogers, J.C. and Mundy, J. (2000) Caleosins: Ca^{2+} -binding proteins associated with lipid bodies. *Plant Mol. Biol.* 44, 463-476.
- Nelson, A.J. and Bushnell, W.R. (1997) Transient expression of anthocyanin genes in barley epidermal cells: Potential for use in evaluation of disease response genes. *Transgenic Res.* 6, 233-244.
- Nicholas, K.B. and Nicholas, H.B.jr. (1997) GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. Distributed by the author.
- Nishiuchi, T., Hamada, T., Kodama, H. and Iba, K. (1997) Wounding changes the spatial expression pattern of the *Arabidopsis* plastid ω -3 fatty acid desaturase gene (*FAD7*) through different signal transduction pathways. *Plant cell* 9, 1701-1712.
- Nuccio, M.L. and Thomas, T.L. (1999) *ATS1* and *ATS2*: two novel embryo-specific genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 39, 1153-1163.
- Oecking, C. and Hagemann, K. (1999) Association of 14-3-3 proteins with the C-terminal autoinhibitory domain of the plant plasma-membrane H^+ -ATPase generates a fusaric acid-binding complex. *Planta* 207, 480-482.
- Oerke, E.-C., Weber, A., Dehne, H.-W. and Schönbeck, F. (1994) Trends and changes in crop production and losses since 1965. In: *Crop production and crop protection*. Oerke, Dehne, Schönbeck and Weber, eds., Elsevier Science, Amsterdam, Niederlande, 743.

- Ortel, B., Atzorn, R., Hause, B., Feussner, I., Miersch, O. and Wasternack, C. (1999) Jasmonate-induced gene expression of barley (*Hordeum vulgare*) leaves - the link between jasmonate and abscisic acid. *Plant Growth Regulation* 29 (1-2), 113-122.
- Ouchi, S., Oku, H. and Hibino, C. (1976) Localization of induced resistance and susceptibility in barley leaves inoculated with the powdery mildew fungus. *Phytopathology* 66, 901-905.
- Ouchi, S., Oku, H., Hibino, C. and Akiyama, I. (1974) Induction of accessibility and resistance in leaves of barley by some races of *Erysiphe graminis*. *Phytopathol. Z.* 79, 24-34.
- Penheiter, A.R., Duff, S.M. and Sarath, G. (1997) Soybean root nodule acid phosphatase. *Plant Physiol.* 114, 597-604.
- Penninckx, I.A.M.A., Eggermont, K., Terras, F.R.G., Thomma, B.P.H.J., De Samblanx, G.W., Buchala, A., Métraux, J.-P., Manners, J.M. and Broekaert, W.F. (1996) Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in *Arabidopsis* follows a salicylic acid-independent pathway. *Plant Cell* 8, 2309-2323.
- Peterhänsel, C., Freialdenhoven, A., Kurth, J., Kolsch, R. and Schulze-Lefert, P. (1997) Interaction analyses of genes required for resistance responses to powdery mildew in barley reveal distinct pathways leading to leaf cell death. *Plant Cell* 9, 1397-1409.
- Petersen, M., Brodersen, P., Næsted, H., Andreasson, E., Lindhart, U., Johansen, B., Nielsen, H.B., Lacy, M., Austin, M.J., Parker, J.E., Sharma, S.B., Klessig, D.F., Martienssen, R., Mattsson, O., Jensen, A.B. and Mundy, J. (2000) Arabidopsis MAP kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell* 103 (7), 1111-1120.
- Pieterse, C.M., van Wees, S.C., van Pelt, J.A., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, H., Weisbeek, P.J. and van Loon, L.C. (1998) A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *arabidopsis*. *Plant Cell* 10 (9), 1571-1580.
- Pieterse, C.M.J. and van Loon, L.C. (1999) Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends Plant Science* 4 (2), 52-58.
- Proust, J., Houlne, G., Schantz, M.L., Shen, W.H. and Schantz, R. (1999) Regulation of biosynthesis and cellular localization of Sp32 annexins in tobacco BY2 cells. *Plant Mol. Biol.* 39 (2), 361-372.
- Rancé, I., Fournier, J. and Esquerré-Tugayé, M.-T. (1998) The incompatible interaction between *Phytophthora parasitica* var. *nicotiana* race 0 and tobacco is suppressed in transgenic plants expressing antisense lipoxygenase sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 6554-6559.
- Rasmussen, J.B., Hammerschmidt, R. and Zook, M.N. (1991) Systemic induction of salicylic acid accumulation in cucumber after inoculation with *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Plant Physiol.* 97, 1342-1347.
- Rauscher, M., Ádám A.L., Wirtz, S., Guggenheim, R., Mendgen, K. and Deising, H.B. (1999) PR-1 protein inhibits the differentiation of rust infection hyphae in leaves of acquired resistant broad bean. *Plant J.* 19 (6), 625-633.
- Reimann-Philipp, U., Schrader, G., Martinoia, E., Barkholt, V. and Apel, K. (1989) Intracellular thionins of barley: A second group of leaf thionins closely related to but distinct from cell wall-bound thionins. *J. Biol. Chem.* 264, 8978-8984.
- Reinbothe, S., Mollenhauer, B. and Reinbothe, C. (1994) JIPs and RIPs: The regulation of plant gene expression by jasmonates in response to environmental cues and pathogens. *Plant Cell* 6, 1197-1209.

- Roberts, M.R. and Bowles, D.J. (1999) Fusicoccin, 14-3-3 proteins, and defense responses in tomato plants. *Plant Physiol.* 119, 1243-1250.
- Roberts, T.R. and Hutson, D.H. (1999) Metabolic pathways of agrochemicals. Part 2: Insecticides and Fungicides. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.
- Rosahl, S. (1996) Lipoxygenases in plants - their role in development and stress response. *Z. Naturforsch. Sect. C J. Biosci.* 51, 123-138.
- Ross, A.F. (1961) Systemic acquired resistance induced by localized virus infection in plants. *Virology* 14, 340-358.
- Rundle, S.J. and Zielinski, R.E. (1991) Organization and expression of two tandemly oriented genes encoding ribulosebiphosphate carboxylase/oxygenase activase in barley. *J. Biol. Chem.* 266 (8), 4677-4685.
- Ryals, J., Neuenschwander, U.H., Willits, M.G., Molina, A., Steiner, H.-Y. and Hunt, M.D. (1996) Systemic Acquired Resistance. *Plant Cell* 8, 1809-1819.
- Ryals, J., Weymann, K., Lawton, K., Friedrich, L., Ellis, D., Steiner, H.-Y., Johnson, J., Delaney, T.P., Jesse, T., Vos, P. and Uknes, S. (1997) The *Arabidopsis* NIM1 protein shows homology to the mammalian transcription factor inhibitor I κ B. *Plant Cell* 9, 425-439.
- Ryan, C.A. (1990) Protease inhibitors in plants: Genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 28, 425-449.
- Ryan, C.A. (2000) The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. *Biochim. Biophys. Acta* 1477, 112-121.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: a laboratory manual. 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74, 5463.
- Sarhan, A.R.T., Király, Z., Sziráki, I. and Smedegård-Petersen, V. (1991) Increased levels of cytokinins in barley leaves having the systemic acquired resistance to *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker. *J. Phytopathology* 113, 101-108.
- Schaffrath, U., Freydl, E. and Dudler, R. (1997) Evidence for different signaling pathways activated by inducers of Acquired Resistance in wheat. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10 (6), 779-783.
- Schaffrath, U., Zabbai, F. and Dudler, R. (2000) Characterization of RCI-1, a chloroplast rice lipoxygenase whose synthesis is induced by chemical plant resistance activators. *Eur. J. Biochem.* 267, 5935-5942.
- Scheel, D. (1998) Resistance response physiology and signal transduction. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1, 305-310.
- Schiffer, R. (1998) Cytologische, molekulare und biochemische Analyse der Funktion des *Mla-12* Locus der Gerste. Dissertation RWTH Aachen.
- Schiffer, R., Görg, R., Jarosch, B., Beckhove, U., Bahrenberg, G., Kogel, K.-H. and Schulze-Lefert, P. (1997) Tissue dependence and differential cordycepin sensitivity of race-specific resistance responses in the barley-powdery mildew interaction. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10 (7), 830-839.
- Schlösser, E. (1997) Allgemeine Phytopathologie. 2nd edition, Thieme, Stuttgart.

- Schneider, M., Schweizer, P., Meuwly, P. and Métraux, J.-P. (1996) Systemic Acquired Resistance in plants. Intern. Review Cytology 168, 303-340.
- Schultz, T.F., Medina, J., Hill, A. and Quatrano, R.S. (1998) 14-3-3 proteins are part of an abscisic acid-VIVIPAROUS1 (VP1) response complex in the *Em* promoter and interact with VP1 and EmBP1. Plant Cell 10, 837-847.
- Schweizer, P., Buchala, A. and Métraux, J.P. (1997) Gene-expression patterns and levels of jasmonic acid in rice treated with the resistance inducer 2,6-dichlorisonicotinic acid. Plant Physiol. 115, 61-70.
- Schweizer, P., Buchala, A., Dudler, R. and Métraux, J.-P. (1998) Induced systemic resistance in wounded rice plants. Plant Journal 14 (4), 475-481.
- Schweizer, P., Jeanguenat, D., Whitacre, D., Métraux, J.-P. and Mössinger, E. (1996) Induction of resistance in barley against *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei* by free cutin monomers. Physiol. Mol. Plant Pathol. 49, 103-120.
- Schweizer, P., Pokorný, J., Abderhalden, O. and Dudler, R. (1999) A transient assay system for the functional assessment of defense related genes in wheat. Mol. Plant-Microbe Interact. 12, 647-654.
- Seehaus, K. and Tenhaken, R. (1998) Cloning of genes by mRNA differential display induced during the hypersensitive reaction of soybean after inoculation with *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. Plant Mol. Biol. 38, 1225-1234.
- Segura, A., Moreno, M., Madueño, F., Molina, A. and García-Olmedo, F. (1999) Snakin-1, a peptide from potato that is active against pathogens. MPMI 12 (1), 16-23.
- Sessa, G., Yang, X.Q., Raz, V., Eyal, Y. and Fluhr, R. (1995) Dark induction and subcellular localization of the pathogenesis-related PRB-1b protein. Plant Mol. Biol. 28 (3), 537-547.
- Shaner, D.L., Baltruschat, H.S. and Nelgen, N. (2000) Herbicidal compositions and method of safening herbicides using bezothiazole derivatives. EP 1021953A1.
- Shirasu, K., Nielsen, K., Piffanelli, P., Oliver, R. and Schulze-Lefert, P. (1999) Cell-autonomous complementation of *mlo* resistance using a biolistic transient expression system. Plant J. 17, 293-299.
- Shirasu, K., Schulman, A.H., Lahaye, T. and Schulze-Lefert, P. (2000) A contiguous 66-kb barley DNA sequence provides evidence for reversible genome expansion. Genome Res. 10 (7), 908-915.
- Siegrist, J., Orober, M. and Buchenauer, H. (2000) β -Aminobutyric acid-mediated enhancement of resistance in tobacco to tobacco mosaic virus depends on the accumulation on salicylic acid. Physiol. Mol. Plant Pathol. 56, 95-106.
- Smith, J.A. and Métraux, J.-P. (1991) *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* induces resistance to *Pyricularia oryzae* in rice. Physiol. Mol. Plant Pathol. 39, 451-461.
- Somssich, I.E. and Hahlbrock, K. (1998) Pathogen defence in plants – paradigm of biological complexity. Trends Plant Sci. 3 (3), 86-90.
- Song, S.K., Choi, Y., Moon, Y.H., Kim, S.G., Choi, Y.D. and Lee, J.S. (2000) Systemic induction of a *Phytolacca insularis* antiviral protein gene by mechanical wounding, jasmonic acid, and abscisic acid. Plant Mol. Biol. 43 (4), 439-450.
- Steinebrunner, I.A., Jeter, C.R., Song, C. and Roux, S.J. (2000) Molecular and biochemical comparison of two different apyrases from *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol. Biochem. 38, 913-922.

- Steiner, U., Oerke, E.C. and Schönbeck, F. (1988) Zur Wirksamkeit der induzierten Resistenz unter praktischen Anbaubedingungen. *Z. Pflanzenkr. Pflanzenschutz* 95, 506-517.
- Sticher, L., Mauch-Mani, B. and Métraux, J.-P. (1997) Systemic Acquired Resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 35, 235-270.
- Stirpe, F., Barbieri, L., Battelli, M.G., Soria, M. and Lippi, D.A. (1992) Ribosome-inactivating proteins from plants: present status and future prospects. *Biotechnology* 10 (4), 405-12.
- Takahashi, S., Katagiri, T., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (2000) An *Arabidopsis* gene encoding a Ca^{2+} -binding protein is induced by abscisic acid during dehydration. *Plant Cell Physiol.* 41 (7), 898-903.
- Tamayo, M.C., Rufat, M., Bravo, J.M. and San Segundo, B. (2000) Accumulation of a maize proteinase inhibitor in response to wounding and insect feeding, and characterization of its activity toward digestive proteinases of *Spodoptera littoralis* larvae. *Planta* 211, 62-71.
- Thomas, C., Rajagopal, A., Windsor, B., Dudler, R., Lloyd, A. and Roux, S.J. (2000) A role for ectophosphatase in xenobiotic resistance. *Plant Cell* 12, 519-533.
- Thomas, C., Sun, Y., Naus, K., Lloyd, A. and Roux, S. (1999) Apyrase functions in plant phosphate nutrition and mobilizes phosphate from extracellular ATP. *Plant Physiol.* 119, 543-551.
- Thomma, B.P.H.J., Eggermont, K., Penninckx, I.A.M.A., Mauch-Mani, B., Vogelsang, R., Cammue, B.P.A. and Broekaert, W.F. (1998) Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 15107-15111.
- Thomma, B.P.H.J., Penninckx, I.A.M.A., Broekaert, W.F. and Cammue, B.P.A. (2001) The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*. *Curr. Op. Immunology* 13, 63-68.
- Thordal-Christensen, H. and Smedegård-Petersen, V. (1988) Comparison of resistance-inducing abilities of virulent and avirulent races of *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei* and a race of *Erysiphe graminis* f.sp. *tritici* in barley. *Plant Pathology* 37, 20-27.
- Torp, J. and Jørgensen, J.H. (1986) Modification of barley powdery mildew resistance gene *Ml-a12* by induced mutations. *Can. J. Genet. Cytol.* 28, 725-731.
- Tosa, Y and Shishiyama, J. (1984) Defense reactions of barley cultivars to an inappropriate *forma specialis* of the powdery mildew fungus of gramineous plants.
- Uknes, S.J., Mauch-Mani, B., Moyer, M., Potter, S., Williams, S., Dincher, S., Chandler, D., Slusarenko, A., Ward, E. and Ryals, J. (1992) Acquired resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 4, 645-656.
- Urwin, P.E., Lilley, C.J., Mc Pherson, M.J. and Atkinson, H.J. (1997) Resistance to both cyst and root-knot nematodes conferred by transgenic *Arabidopsis* expressing a modified plant cystatin. *Plant J.* 12 (2), 455-461.
- Vallélian-Bindschedler, L., Métraux, J.-P. and Schweizer, P. (1998) Salicylic acid accumulation in barley is pathogen specific but not required for defense-gene activation. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11 (7), 702-705.
- van der Plank, J.E. (1984) Disease resistance in plants. 2nd edition, Academic Press, Orlando, USA.
- van Eldik, L.J., Zengedui, J.G., Marshak, D.R. and Watterson, D.M. (1982) Calcium-binding proteins and the molecular basis of calcium action. *Intern. Rev. Cytol.* 77, 1-61.

- van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M. and Pieterse, C.M.J. (1998) Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36, 453-483.
- van Wees, S.C., de Swart, E.A., van Pelt, J.A., van Loon, L.C. and Pieterse, C.M. (2000) Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (15), 8711-8716.
- Verbene, M.C., Verpoorte, R., Bol, J.F., Mercado-Blanco, J. and Lindthorst, H.J. (2000) Overproduction of salicylic acid in plants by bacterial transgenes enhances pathogen resistance. *Nat. Biotechnol.* 18 (7), 779-783.
- Vernooij, B., Friedrich, L., Morse, A., Reist, R., Kolditz-Jawhar, R., Ward, E., Uknes, S., Kessmann, H. and Ryals, J. (1994) Salicylic acid is not the translocated signal responsible for inducing systemic acquired resistance but is required in signal transduction. *Plant Cell* 6, 959-965.
- Vignutelli, A., Wasternack, C., Apel, K. and Bohlmann, H. (1998) Systemic and local induction of an *Arabidopsis* thionin gene by wounding and pathogens. *Plant Journal* 14 (3), 285-295.
- Vörös, K., Feussner, I., Kuhn, H., Lee, J., Graner, A., Lobler, M., Parthier, B. and Wasternack, C. (1998) Characterization of a methyljasmonate-inducible lipoxygenase from barley (*Hordeum vulgare* cv. Salome) leaves. *Eur. J. Biochem.* 251 (1-2), 36-44.
- Ward, E.R., Ukness, S.J., Williams, S.C., Dincher, S.S., Wiederhold, D.L., Alexander, D.C., Al-Goy, P., Métraux, J.-P. and Ryals, J. (1991) Coordinate Gene activity in response to agents that induce Systemic Acquired Resistance. *Plant Cell* 3, 1085-1094.
- Wasternack, C. (1994) Jasmonate-induced alteration of gene expression in barley. *Trends in Comparat. Physiol.* 1, 1255-1268.
- Weichert, H., Stenzel, I., Berndt, E., Wasternack, C. and Feussner, I. (1999) Metabolic profiling of oxylipins upon salicylate treatment in barley leaves - preferential induction of the reductase pathway by salicylate. *FEBS letters* 464 (3), 133-137.
- Weymann, K., Hunt, M., Uknes, S., Neuenschwander, U., Lawton, K., Steiner, H.-Y. and Ryals, J. (1995) Suppression and restoration of lesion formation in *Arabidopsis lsd* mutants. *Plant Cell* 7, 2013-2022.
- Williamson, V.M. and Colwell, G. (1991) Acid phosphatase-1 from nematode resistant tomato. Isolation and characterization of its gene. *Plant Physiol.* 97, 139-146.
- Wolter, M., Hollricher, K., Salamini, F. and Schulze-Lefert, P. (1993) The *mlo* resistance alleles to powdery mildew infection in barley trigger a developmentally controlled defence mimic phenotype. *Mol. Gen. Genet.* 239, 122-128.
- Xu, Y., Chang, P.F.L., Liu, D., Narasimhan, M.L., Raghothama, K.G., Hasegawa, P.M. and Bressan, R.A. (1994) *Plant Cell* 6 (8), 1077-1085.
- Yalpani, N., Shulaev, V. and Raskin, I. (1993) Endogenous salicylic acid levels correlate with the accumulation of pathogenesis-related proteins and virus resistance in tobacco. *Phytopathology* 83: 702-708.
- Yamaguchi, K., von Knoblauch, K. and Subramanian, A.R. (2000) The plastid ribosomal proteins. Identification of all the proteins in the 30S subunit of an organelle ribosome (chloroplast). *J. Biol. Chem.* 275 (37), 26455-28465.

- Zhang, Y., Fan, W., Kinkema, M., Li, X. and Dong, X. (1999) Interaction of NPR1 with basic leucine zipper protein transcription factors that bind sequences required for salicylic acid induction of the *PR-I* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 6523-6528.
- Zhou, F., Andersen, C.H., Burhenne, K., Fischer, P.H., Collinge, D.B. and Thordal-Christensen, H. (2000) Proton extrusion is an essential signalling component in HR of epidermal single cell in the barley-powdery mildew interaction. *Plant J.* 23 (2), 245-254.
- Zimmerli, L., Jakab, G., Métraux, J.-P. and Mauch-Mani, B. (2000) Potentiation of pathogen-specific defense mechanisms in *Arabidopsis* by β -aminobutyric acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (23), 12920-12925.

8 ANHANG

Tab. 8.1 Konsensussequenzen der überprüften cDNA-Fragmente aus den SSH-Klonen (s. 3.2).

Klon	Konsensussequenz	x ¹
1-62	ACAAGTCAGCCCAGGACATTGCTCTtGCTGAcTtgCTaCCAcTcaCCCCGatTAGgcTtG 60 GGcTgGCacTCAaCTTctcagTGTTcTACTatGAaaTCCTGaaCTCTCCAGACcGtGcTd 120 GcAACCTTGCCAgGcaGGCATTtTGATGArGCTaTtGCTGrGcTGGaCTCCCTCGGCGaGG 180 AaTCctaCAaGGACaGCACcTkGaTCatGCAACTTCTTCGTGACaACTTGaCCCTCTGGA 240 CCTCCGATAACGCAGAGGAGGGTGGTGATGaGaTCAAGGaaGCCGCCTCAAaGCCTGAGG 300 GAGaGGGGCACTGaTTGGCCcTCAAGAGTGTGCCCAAGTTtATtTCTGAGtCcAtTtACG 360 CaGCTaCCTGTaTCATtCGGaTCATaAGatgt 392 Vektor ² : (pTAdv); pGEM-T, RNA-Sonde ³ : M13rev/nested1: SP6	2
1-90	CTCCGTGCGcGCTGTGAGAAGGTGGGAGTgGCTGATGTTATGAGCCACATMTCAACTGG 60 TGGTGGCGCTAGCTTGGAGTTGTTGGAAGGAAAGCAGCTtCCTGGAGtTCGTtGCACTTG 120 ATGAAGGTgTCGTGACGAGMTCGGTGGCCgTATGAGGCTAAGCTTCATTtTGTTGCATcT 180 TAATWCCTtTCACGT 195 Vektor ² : pTAdv, RNA-Sonde ³ : M13univ/nested2R: T7	1
1-93	ACAACCTCGAcTTCGGCCGCGGGACcCnCAGAmAGGAGGCcGAcTTCACCACGGACGACA 60 TGAmCCcCGGCaAGAAgCCGnGAGCGnGnGAgGCGnGCAnGGAnGGGCACATGGCcCATg 120 GcTCAnGGCAGnGCAAAGCGnGtGGCAACAGCGtGtGCGGCGtGCATAtGtAGCACAGGG 180 AAGACGAhCTCAGncTTGGGAnGnAGGntGAGGnnCACcCAnCCGAtGAAAnGt 234 Vektor ² : (pTAdv); pGEM-T, RNA-Sonde ³ : M13rev/nested1: SP6	2
2-13 Bci-3	ACGTGATGGAGGGGAGTGcACCCGGTGCTGcCGGAGACGAAGCGGcTCTAcTACAAGCTAC 60 TCAAGGTGGGCATCAAGCCGGTATTcATcACAGGCCGGACGGAGGATAAGAgGGCCGTCA 120 CCGTCGGGAACcTcGCAGCCAGGGcTTcTCCGGGTGGATGAGCcTGAcGcTCAAGCAAC 180 ATGGGTTCaAGGgcTCCGCCATATCCTACAAGTCCGCCGAGAGGAAGAAGCTGGAGGATG 240 CcGGGT 246 Vektor ² : (pCRII-TOPO); pGEM-T, RNA-Sonde ³ : M13rev/nested1: SP6	3
2-94 Bci-6	ACATGAAGAGCAGCGACGGCAAGGTCTACGACTCCTTCACCAcCCACAGGGAtTACCGCG 60 ACGTGCTCAGCTGCGTGcACGACAGCTGCTTCCCCACCAGCTCGCTAGCTAGCTCATAT 120 CGTCCGGCCGTcATGTCAATGTAATGGAGGGTCATCCATCCAATAAAATTGTGGGCATGT 180 GTTGAGTAATAAAaTTGGTCAGCTGCACaaTTTaTATGTGCTaGTAAaAaGaTCATGCAA 240 GAGGTGGGTGTATGCTCGTTATATATGCTTTGTAACCTTCATGTcATATTaTTATGGG 300 TTAATaAaaaCATCCTTTaTCAAAAAaaaaAAAAAAAAAAGCTTgT 346 Vektor ² : pCRII-TOPO, RNA-Sonde ³ : M13univ/nested1: T7	2

Klon	Konsensussequenz	x ¹
3-01	ACCAGCCGGGGTTGTTTGGAGGACAAAGGGCACCGTGAATGGCGGCAGAGGCAGCAGTAGC	60 2
Bci-4	AAATGcATACTCGCAACCGATTGCaACaACCCTTGGATGGTTTCTGTAGGAGTGATGAA	120
	GCcATCCTTGTTCGGTTCGAAAAAGGAGAcATGTTTCTGAAGCTCCGTcATGTTTGCAGG	180
	ATCAAACCTTGGCCACGGCATGCcCCCAGTTCCAGCTAAAGATCCACAGAAGCAGAAGAGA	240
	TGGTAGCTTCAGAGAAGCcGCTGCcAGCGATTGTcGATGACCGGGCATTGTcGCcTG TAG	300
	CTATGATCCTGA	312
	Vektor ² : pTAdv	
3-06	ACTTCGACCCGCTCGcGCCTTGCCGACGACCCTGTTACCTTCGCGGAGCTTAAGGTGAAG	60 1
	GAGATCAAGAATGGCCGTCTTGCCATGTTCTCTATGTTTCGGGTCTTCGTGCAAGCTATC	120
	GTCaCCgGCAAGGGCCCATTTGGAGAACCTGTTTCGACCaCCTCGACGACCCTGTGCGCAAT	180
	AATGCATGGGTTTTTCGCCMCCAaATTTGCgCCTGGaTCTTAGGCTGCCCCACGCGCaACG	240
	TGGCCTGCCATTGTAAAATGTAAATTATTTCCCATGTGTGTGCAATaGCAACGAATGGTCG	300
	ATGtGaTCCCTGAAATTGAAAAAAGAAAAaAAAAAaGCTTGT	354
	Vektor ² : pCRII-TOPO	
3-12	ACAGTATTGGTTGAWATGATTGCNAATCCGGCCCTAGCTCGCGCAGTAAGGGCATCTCCA	60 3
Bci-9	ATGATTGTATGAYCATCGTTGGTAATATTGCCACATAGATGATTTTGTATGACATGACGCA	20
	TAATAAAAGAAGAAAGAGAATGAaATCGTATGAaCTTGAAGCAACGGTTCACGCACAAGC	180
	tCCGAGGCAAAGCATGGTTATTTCTTCCATGTTTGTAGTGACCCGCAATGCATGCATGGAG	240
	GTGTATCTTACGATTGANCGCaATTAATAAAGTGTTCGGT	281
	Vektor ² : pTAdv, RNA-Sonde ³ : M13univ/transkr.5'(U. Beckhove): T7	
3-16	ACTTATCTTGAGCATGACATTAGTCAGCAAACATCCGGCGaTCATCAGAAGaTCTTACTA	60 1
	GCCTATGTGGGCATTCCACGCTACGAAGGTCCAGAGGTTGATCCCACTATAGTGACACAT	120
	GATGCGAAGGACCTCTACAAAGCTGGTGAGAAGAAGCTGGGCACAGATGAGAAAACCTTC	180
	ATCCGCATCTTCACTGAACGCAGCTGGGCACACATGGCAGCTGTTGCTTCTGCTTACCAG	240
	CACATGTATGMTCGGTCATTACAGAAGGTTGTGAAGAGTGAAACATCTGGAACTTTGAA	300
	GTTGCTCTGATaACTATCCTCAGATGTGCTGAGAATCCAGCTAAGTaTTTTGCTAAGGTG	360
	TTAAGGAAGTCCATGAAAGGTCTAGGT	387
	Vektor ² : pTAdv, RNA-Sonde ³ : M13univ/nested1: T7	
3-33	ACTTCACgGCAGCAAGcAGGCATGCACAGCTCCTCAGCTAGCaTCAAGAATCctTGGAAT	60 1
	GGTGAGCAGAAGCATRGtAGTCCCACaAGTCTTGATCACAATCTTCTGAGAGTAGATAAA	120
	CAGGCTCGAcTCAGATAGCACATACGAGTCAAAGTCCTTGTTGGAGAGcTCGGACACAAT	180
	GGTGACCGTGCAAGATCAANAACAGAGTCAATCTGGGCCCTANAGAGGGCGCGCAGGCC	240
	ACGACCACGANGGNCANNAAGATTNATGCCNCGNTNAANGTGATTTCNANGNNCNTCTC	300
	Vektor ² : pCRII-TOPO	
3-39	ACCTTCAaGGaTGAGAAcTyCCAaTtGGTTCaTACTGGaCChGGAGTGctCAGCATGGCT	60 6
	AATGCTGGACCGAACaCCAACGGCAGCCAATTCTTCATCTGCACAGTCAAGACTCCGTGG	120
	yTGGACGGGAGACACGTTGTchTTGgCCAGGTTCTTGAAGGCATGGACATCGTAAGGvTG	180
	ATAGAgTCAtCtGAGACTGACAGAGGTGaCCGCCCCGaGAAGAAGGTGGTCATTaGTGAG	240
	gTGCGGGGaGcTTCCAGTGGTCTGAGTtTCATCTAGATGGCTATcaTCTTGATCCCCGC	300
	ATCTGGaTTTTtGCTCTGGACTTGTTACAGGTcTTTCCCCTAGTAGTTAgaGGCCGTGCTG	360
	AGTTGAAGCCAAGATTTCaTATcTGnrGgATACgAcATwtAACTACTTTtGCCCGGAAT	420
	AAaatGCGATTGTtTTcCcyAGaMAaamraVamhccahcanAaaaaaacTTgt	474
	Vektor ² : pCRII-TOPO	

Klon	Konsensussequenz	x ¹
3-41	AccAGCcGGGGTTGTTTgAGGAGcAAGGGcACcGTGAATGGcGGcAGAGgcAgcAGTAgc	60
Bci-4	AAATGcATAActcGCAACcGATTGCdAcAAACCcTTGGATGGTTTcTGTAAGAGTGATGAA	120
	GCcaTCctTGTTCCGGTcGAAAAAGGAGacATGTTTcTGAAGbtCcGTcATGTTTgCAGG	180
	ATcAAAcTTGGCcAcGGcAtGCCCCcAGTTCCAgcTAAAGATCcAcAGAAGcAGAAGAGA	240
	TGGTAGcTTcAGAGAAGCcGcTGCcAGcGATTGTcGATGACcGGGCATTGTcGCcTGTA	300
	cTATGATc	308
	Vektor ² : pTAdv, RNA-Sonde ³ : M13univ/nested1: T7	
3-66	ACCTGCATTTCTCATCTCAAGATCTTCATGGGGTCTTTGATTTTGGCATAGCTTTTCTCC	60
	AATGTATATCTATGATTGGCAACGAGGATTTAAATAGCACTGCTAGCAACAGCAGCTTAG	120
	GACCTCCAGGGAGATGTAACAATTCTTGCTGCTGCTACGTTATTGAGATGTATAGTTTCAT	180
	ACTGAGGTATCGCTCCATGTATTATATGTCATGATGGGCAAACACGGATCAAAGTTTTC	240
	CGTAAAAAAAAAAAAaa	256
	Vektor ² : pTAdv	
3-70	ACACCrGCgACGGCGAGGCCGAGCTGCCAAAGAGAACATGTTTCGTCAAGAACTACAGCT	60
	AcTgATCCGTCGCGGAGcTgwcctAthkasataatCtACCTACGGAGGGAGAGTGCTAGT	120
	wGCGCCTTGAGCAGCTTGAGGGCACCTTAGCCAGCCAGTGTGTCTGTCGTTGTTACAGGTC	180
	GAGACCAGCTCTGATGGaaGAgATGGaCGGaGAGCATATnCTGTGTttTaCCAcCctAAG	240
	taAAAAaaacTTTGGAATGgttndaAAAAaaAAAAAAAAAAAAAAAAaaabcTTkT	295
	Vektor ² : pCRII-TOPO	
3-76	AyAGAAgCyTGGaCAgTTCyACTCGGaAGyTTCGGTTyGCgCTAyyGTTyCygATGCTCG	60
Bci-8	CyTACyCATTyTACTTGTgGTCAAGGaGTCCAGGgAAGTcAGGcTCGCATTTcCACcCGA	120
	gCAGCGATTTGTTCCAGCcGAACGAgAAGAAGCAyATAcTGAYGTcgAyGyATGyTGGy	180
	TTGcYATGgyTGGyyTgYTCGCTGGGyTyAyTGCyGTgATGGGcYCCyTTCAGATAYTyA	240
	agCTCTAyGyCyGTyyCyTAyTGGaTTTTTgTTATgTgYtGGaCTTTgTyACCTACyTGC	300
	aCyAycACGGCyACAACGAYaAGCTTyyyTGGTATyGyGGAAAGGyATGGaGCTATCTgC	360
	gCgGgGgCyTGAYaACGCTTGACAGGGACTACGGGTGGCTCAACAACATCCACCACGACA	420
	TCGGGACTCACGTGATCCGCCATCTTTTCCCGCAAATCCCGCATTACCATCTAGTGGAGG	480
	CGACCGAGGCGGCGAACAGsTGCTAGGGAAGT	512
	Vektor ² : pGEM-T, RNA-Sonde ³ : M13univ/nested2R: T7	
3-77	ACAAGGTTTATGTTGGCAATCTTGCGAAGAAAGTGACGACGGAAGTTCTCAAGAACTTCT	60
Bci-5	TCTCTGAAAAGGGGGAGGTCCTCAGTGCCACGGTATCCCGAATTCGGGAACCCCAAAGT	120
	CCAAGGGATATGGTTTTGTACGTTTTCTTCAGAGGAGGAAGTTGAAGCTGTGGTTTCTA	180
	CTTTCAACAACACAGAATTGGAAGGACAAACCATCCGTGTGAATAGAGCATAGACATAGC	240
	AGAAATTTTCGCACCTGGAGGCAAGGGGAGAATATCTCGGAGAACaCCTGTAGACGAGGGGG	300
	AGTTTGAGACTAGATTTTATAACAAAGTTTTAAAGGCCTTTGATGTAAATTTCACTCTGGC	360
	TCTAAGCAATTTTTTGTATAAtAaCAACATATGGAAGAaTTTTGATTGTCAAGCCCGTTG	420
	TTCATATGAAGCAGTTGTTGTTTACCcCAAAAAaAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGC	480
	TTGT	484
	Vektor ² : pTAdv, RNA-Sonde ³ : M13univ/nested1: T7	

Klon	Konsensussequenz	x ¹
3-83	CGGCGGCAagcGTCTCCcTgAaGagCAGCCTCTyCyTgtcTTCCCCCTTTCCGACTTCG 60 GCGgcGCGsCCATCTCCATCTCAGCCCAGAATAGGAGACGGTCATGGCAGCCGAGGGGGg 120 CGAGAATGCAGGTGgCAGCAGCTGCAGACTCCAAGAACATTCTGATCATGGGGGGCACGA 180 GGTTCATTGGTCTCTTCCTGTCCAGGAACTTGTCCAGGAGGgACACCAGGTCACATTGT 240 TCACCAGAGGAAAGGCACCCATAACCCAGCAGTTGCCAGGTGAATCAGATGCAGAGTATG 300 CAGAGTTCTCTTCCAAGGTGCTGCATTTGAAAGGTGATAGGAAAGACTTTGATTTTCGTCA 360 AGACCAGCCTTTCTGCTAAGGGCTTTAATGTGCTCTATGATATTAATGGACGCGAGGCCA 420 CTGAAGTATCCCCCATACTAGAAGCGTTGCCAAACCTGGAACAGTTTATCTATTGCTCAT 480 CGGCAGGAGTCTACCTTAAGTCAGACCTGCTCCCACACTTTGAGACCGACGCTGTGGACC 540 CGAAAAGCCGGCATAAGGGAAAGCTGGAGACAGAGAGCCTGCTGGAGACGAGCGGCGTGA 600 ACTGGACGTCCATCAGACCGGTCTACATCTACGGCcCTCTCAACTACAACCTGTGGAGG 660 AGTGGTTCTTCCACCGGCTCaAGGCTGGTCgCCCGATcCCCaTcCCTAACGCTGGGAACC 720 agATcacCCarCTcGGsCATGTCAAGGATTTGGcGacGGCcTtcATcAAGgTCctCGgmA 780 acCCCAAGGCGagCAaGCAGgTkt 804 Vektor ² : pTAdv	2
3-91	ACATACATAATGTAGAAGTAGGGGAAARAGGCATCAAACCTTGCTTTGTAAACAAATTCGT 60 AAATGTTTTTaACCCGGATAAGTGGTTTGCTCGTGCAATTCTATAACCATCTGARATAGC 120 ATCAAGTGATTACCACAGCAATCTCACCCCTGATGCTCGCCTCCGTTGTGAACTCAAAAC 180 TGAAACAAAGTAACAACTCCACGCTTAAGAGAGCTCAGCCATCACATCTGACACTCTCA 240 ACACAATGTAGTTGGTGCCATCAGTGCCCTTGAACCTCGCCGCCTGCGT 288 Vektor ² : pTAdv, RNA-Sonde ³ : M13univ/nested1: T7	1
4-03	ACTTCTGTTGTATAGGCCGCATAGAGTATCTTTnGaTCACCAACCATCCTATCATGATCA 60 ANATCTCCAGCTAACGAGATAgGTCCAAGCCCACGTGCAAATCGGTGCGCTTGAGGAAAC 120 TTGCTTAGRACTGTtAGCvACCTATTGasTGCvAGGNTACTGTtCACCTCATTAaTvVCC 180 TCTGTGGGAaTGtCCCTGCACTGGTATTGGaCTTCAATATGGATAnvGCAGATGANACG 240 TTTTCTTGAATCAACTTCTTCGCATGCTCCTTGAACATGTCAGCaGCAACCTCATCAAAa 300 AGTTTATATGCaAGTtGTATTCTCCTCACTTCAATGAGCGTGCCTATgTCAAGACCTCTT 360 CCAATAGACTTGAGCTCTAACGCATATaGaCTTTTgGCATTCTCCCGCATAGCAATATCA 420 ATCTGATAGTCCGTGATCCCGAAAAGATGTTTCCATGGAAGTATGARGTCTGATGCATCT 480 CCGAAGACAAGATTTCGACACAAAAaTKRAcTTTKGGRaTGCATCGAGTCTCTCTGTAT 540 AAGCGTCTACCAATCGCCAAGTGCATACTTGCaGCaTCCGCATCATCGAGTCCAAGAGCT 600 TTTTGTGAACTTTTTaATaGCTTcAAcCTCAgT 632 Vektor ² : pCRII-TOPO	2
4-12	GTCAAGTTACGCCTGCCGAATCGAGGATGAgcTGCGCCGCCCCAAAAGCCCCCGCCGGA 60 GAGGAGAAGAAGACGTCATGGCCGGAGGTAGCGGGAAAGTCCATCGAGGAGGCCAAGGAG 120 ATCATCCTTAAGGACATGCCTGAAGCGGACATCGTCGTCTCCAGCCGGCTCGCCGGTG 180 ACCCTCGACTTCAGGACCAACCGTGTCCGCATCTTCGTGACACTGTGCGGTCCACTCCC 240 CACATTGGCTAGCTAGCTTTGCAAGCAAAGGCAACATGGATGCATTGTGGATGCTGATGA 300 ATAAGT 306 Vektor ² : pTAdv, RNA-Sonde ³ : M13univ/nested1: T7	3
Bci-7		

Klon	Konsensussequenz	x ¹
4-40	ACCAGCcGGGGTTGTTTGAGGAGCAAGGGCACCGTGAATGGCGGCAGAGGCAGCAGTAGC	60 1
Bci-4	AAATGCATACTCGCAACCGATTGCaACaAaACCCTTGGATGGTTTCTGTAGGAGTgATGAA	120
	GCCATCCTTGTTCGGTTCGAAAAAGGAGACATGTTTCTGAAGCTCCGTCATGTTTGCaGG	180
	ATCAAACCTTGGCCACGGCATGCCCCCAGTTCCAGCTAAAGATCCACAGAAGCAGAAGAGA	240
	TGGTAGCTTCAGAGAAGCCGCTGCCAGCGATTGTcGATGACCGGGCATTGTGCCTGTAG	300
	CTATGATC	308
	Vektor ² : pTAdv	
4-56	ACATGGGCACGCACGAAGAGCCGGCATGGACAAAGGATGGGGTGATCaACCAGGCATTTG	60 3
Bci-1	AGGAGTTCAAGGAGAGCACCAGGAAGATCGTGGAGCAGGTGGATGAGTGGAaCAACGACC	120
	CcgvCcGgAAAAAccGACACGGCGCCGGCATGGTGCCGTATGTgCTGCTCAGGCCGTGG	180
	ACGGTGATCCACGGACGAGAAGATGGTGATGGAGATGGGCATCCCcaACAGCATCTCCA	240
	TTTGAGCTGCCTTGTGTGTGTGTGTGTAcTcAAActAgGCGTAAAtaAgagtgThTTcAG	300
	TcTcTtGgCCcgggGGTgggTataATgGgAATgAgcaccAaattaTawTTwdhGGacacg	360
	ataTaTaTaTaTaTgttksaCgagataatctcttttctaGaGtcacaaGaTaTtacaTaAa	420
	caaGgcaagattagaaagTctttTtacaGt	450
	Vektor ² : pTAdv	
4-62	ACCAGCcGGGgTWRtTTAAgGAGCAAaGGCACCGTGAATGGCGGCAGAGGCANCAgTAgC	60 1
Bci-4	AAATGCATACTCGCAACCGATTGCAACAAACCCTTGGATGGTTTCTGTAGGAgTRATGAA	120
	GCCATCCTTGTTCGGTTCGAAAAAGGAGACATGTTTCTGAAGCTCCGTCATGTTTGCAGG	180
	ATCAAACCTTGGCCACGGCATGCCCCCAGTTCCAgCTAAAGATCCACAGAAGCANAAGAGA	240
	TGGTANCTTCAGAGAAGCCGCTGCCANCGATTGTCTGATGACCGGGCATTNTCGCCTgTAG	300
	CTATNAT	307
	Vektor ² : pTAdv, RNA-Sonde ³ : M13univ/nested1: T7	
4-76	ACGaCTTCrACAACACCATGGGaggCTTCTACATCGCTCCTGCTTTTCATGGaCaAGCTTG	60 2
	TTGTCCaTCTCTCCaaAaACTTCATGaCCCTGCCCaCaTCaaGaTCCCaCTCaTCTTG	120
	GTaTCTGGGGaGGCaagGGTCaAGGAAAATCATTCaGTGTGAGCTTGTGTTCCGCaGa	180
	TGGGCaTCaACCCCaTCaTGaTGagTGCCGGaGcAGCTGgagaGTGGGaaCGCTGGaGaG	240
	CCaGCCAAGCTCaTCagGCaGNNGTACCTCGGcCGcGaCCa	281
	Vektor ² : pTAdv	
5-03	GkACAAGCkTttttktTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTACATCGGGTTCTArAAAACTTG	60 2
	AAGTAACTTAGATAAAAtATACCAACTATGTGCGTAACCGtGACTGTCTCTTCATGA	120
	GTTTTGCATACGGAAGAGGACACACTGGGGTTAtATACGAcGTAAGTAGGTGTTCAGGAT	180
	CACTTTGAGATCaTtATtAGTTTACGGCCGtTTATGCGtAgAtcACCCNCCyCttAtTCT	240
	TGTAtGCGwArkTTAGCCAcCtcAAwAAAtGcTTAGTTGCTTgTTCCA	289
	Vektor ² : pCRII-TOPO, RNA-Sonde ³ : M13rev/nested1: SP6	

Klon	Konsensussequenz	x ¹
5-74	ACGTGATGGAGGGGAGTGACACCGGTGCTGCCGGAGACGAAGCGGCTCTACTACAAGCTAC 60 1 TCAAGGTGGGCATCAAGCCGGTATTTCATCACAGGCCGGACGGAGGATAAGAgGGCCGTCA 120 CCGTCGGAACCTCCGCAGCCAGGGCTTCTCCGgGTGgATgAgCCTgACgCTCAAgCAAC 180 ATGGGTTCAGGGCTCCGCCATATCCTACAAGTCCGCCGAGAgGAAGAAgCTggAggAtg 240 CCGgGT 246 Vektor ² : pTAdv	
3-83	-AASVSLKSSLXXSSPLSDFGGAXISISAQNRRRSWQPRGARMQVAAAADSKNILIMGGT 59	
A.th.	MMLQQHQPSFSLLTSSLSDFNGAKLHLQVQYKRKVHQPKA-LYVSASSE-KKILIMGGT 58	
1-93	----- * * * * *	
3-83	RFIGLFLSRKLVQEGHQVTLFTRGKAPITQQLPGESDAEYAEFSSKVLHLKGDRKDFDFV 119	
A.th.	RFIGLFLSRILVKEGHQVTLFTRGKSPIAKQLPGESDQDFADFSSKILHLKGDRKDYDFV 118	
1-93	----- ***** ** ***** ** ***** * ***** *	
3-83	KTSLSAKGFNVVYDINGREATEVSPILEALPNLEQFIYCSSAGVYLKSDLLPHFETDAVD 179	
A.th.	KSSLSAEGFDVVYDINGREAEVEPILEALPKLEQYIYCSSAGVYLKSDILPHCEEDAVD 178	
1-93	----- * * * * *	
3-83	PKSRHKGKLETESLLETSGVNWTSIRPVYIYGPLNYPVEEWWFFHRLKAGRPIPIPNAGN 239	
A.th.	PKSRHKGKLETESLLQSKGVNWTSIRPVYIYGPLNYPVEEWWFFHRLKAGRPIPVNSGI 238	
1-93	----- ***** ***** *	
3-83	QITXLXHVKDLATAFIKVLXNPKASKQX----- 267	
A.th.	QISQLGHVKDLATAFLNVLGNEKASREIFNISGEKYVTFDGLAKACAKAGGFPEPEIVHY 298	
1-93	----- ** * ***** ** * *	
3-83	-----	
A.th.	NPKEFDGKKAFFFRDQHFFASVEKAKHVLGWKPEFDLVEGLTDSYNLDFGRGTRKEA 358	
1-93	-----NLDFGRGTXRxEA 13 ***** * *	
3-83	-----	
A.th.	DFTTDDMILSKKLVLQ--- 374	
1-93	DFTTDDMXPGKK----- 25 ***** **	

Abb. 8.1 *Alignment* der Aminosäuresequenzen der Klone 1-93 und 3-83 mit dem sequenzähnlichen *Arabidopsis* (*A.th.*)-Klon (s. 3.2 und 3.3.1.1).

Abb. 8.2a Alignment der Nukleinsäuresequenzen der Klone 2-13 und 5-76 (s. 3.2; 3.3).

```

2-13      ACGTGATGGAGGG-GAGTGCACCGGTGCTGCCGGAGACGAAGCGGCTCTACTACAAGCTA  59
5-76      ACGTGATGGAGGGCGAGTGCACCGGTGCTGCCGGAGACGAAGCGGCTCTACTACAAGCTA  60
          *****

2-13      CTCAAGGTGGGCATCAAGCCGGTATTCATCACAGGCCGGACGGAGGATAAGAGGGCCGTC  119
5-76      CTCAAGGTGGGCATCAAGCCGGTATTCATCACAGGCCGGACGGAGGATAAGARGGCCGTC  120
          *****

2-13      ACCGTCGGGAACCTCCGCAGCCAGGGCTTCTCCGGGTGGATGAGCCTGACGCTCAAGCAA  179
5-76      ACCGTCGGGAACCTCCGCAGCCAGGGCTTCTCCGNGTGNATNANCCTNACNCTCAANCAA  180
          *****

2-13      CATGGGTTC AAGGGCTCCGCCATATCCTACAAGTCCGCCGAGAGGAAGAAGCTGGAGGAT  239
5-76      CATGGGTTC AAGGGCTCCGCCATATCCTACAAGTCCGCCGAGANGAAGAANC'TNNANNAN  240
          *****

2-13      GCCGGGT  246
5-76      NCCGNGT  247
          *** **

```

Abb. 8.2b Alignment der Nukleinsäuresequenzen des Klons 2-13 mit *Bci-3* (s. 3.2). (Konsensussequenz der 5'- und 3'-RACE-Produkte, Jarosch, Dissertation in Vorbereitung)

```

2-13      -----
Bci-3     CTGGAGGCTGGGCGTGGAGGCGTACAACGTGCGGGACTGGAAGACGGTGCCGGCCAAC TG  60

2-13      -----
Bci-3     CGAGGGCTACGTGGGGCACTACATGCTCGGCAACCACTTCCGGCGCGACTGCAAGGTCGT  120

2-13      -----
Bci-3     CATCGACCAGGCCATCGCCTACGTTCGACGGCCTCAAGCTCGCCGGCAACGGCAAGGACGT  180

2-13      -----
Bci-3     GTGGGTCTTCGACATCGACGAGACCACCCTCTCCAACCTCCCTTACTACGCCACGCACGG  240

2-13      -----ACGTGATGGAGGGGAGTGC  19
Bci-3     CTTTGGGGCTAGGCCATACAACGCGACGAGCTTCGACGCGTACGTGATGGAGGGGAGTGC  300
          *****

2-13      ACCGGTGCTGCCGGAGACGAAGCGGCTCTACTACAAGCTACTCAAGGTGGGCATCAAGCC  79
Bci-3     ACCGGTGCTGCCGGAGACGAAGCGGCTCTACTACAAGCTACTCAAGGTGGGCATCAAGCC  360
          *****

2-13      GGTATTCATCACAGGCCGGACGGAGGATAAGAGGGCCGTCACCGTCGGGAACCTCCGCAG  139
Bci-3     GGTATTCATCACAGGCCGGACGGAGGATAAGAGGGCCGTCACCGTCGGGAACCTCCGCAG  420
          *****

2-13      CCAGGGCTTCTCCGGGTGGATGAGCCTGACGCTCAAGCAACATGGGTTC AAGGGCTCCGC  199
Bci-3     CCAGGGCTTCTCCGGGTGGATGAGCCTGACGCTCAAGCAACATGGGTTC AAGGGCTCCGC  480
          *****

2-13      CATATCCTACAAGTCCGCCGAGAGGAAGAAGCTGGAGGATGCCGGGT-----  246
Bci-3     CATATCCTACAAGTCCGCCGAGAGGAAGAAGCTGGAGGATGCCGGGTACGTCATCGTCGG  540
          *****

```

```

2-13 -----
BCI-3 CAACATCGGCGACCAGTGGAGCGACATCCTCGGCGCGCCCAGGGCGCTCGCACCTTCAG 600

2-13 -----
BCI-3 CTGGCCTGACCCCATGTACTACATCGCCTAGGTCGGTTGCGGCTATTTGATTGCCCCGTG 660

2-13 -----
BCI-3 CTCGTGGTCCACGAATAATAAGAATATAGTAGACTTTGTTGGTTTCTTTGAAACCAAGAA 720

2-13 -----
BCI-3 GGAGAACATTAATAGTACCACTTTGAACAATATTGCTGGTAA 762

```

Abb. 8.3 Alignment der Nukleinsäuresequenzen der Klone 3-01, 3-41, 4-40 und 4-62 (s. 3.2, 3.3 und 3.3.1.1).

```

3-1 ACCAGCCGGGGTTGTTTGAGGAGCAAGGGCACCGTGAATGGCGGCAGAGGCAGCAGTAGC 60
3-41 ACCAGCCGGGGTTGTTTGAGGAGCAAGGGCACCGTGAATGGCGGCAGAGGCAGCAGTAGC 60
4-40 ACCAGCCGGGGTTGTTTGAGGAGCAAGGGCACCGTGAATGGCGGCAGAGGCAGCAGTAGC 60
4-62 ACCAGCCGGGGTWRTTTAAGGAGCAAAGGCACCGTGAATGGCGGCAGAGGCANCAAGTAGC 60
***** ** ***** *****

3-1 AAATGCATACTCGCAACCGATTGCAACAAACCCCTGGATGGTTTCTGTAGGAGTGATGAA 120
3-41 AAATGCATACTCGCAACCGATTGCDACAAACCCCTGGATGGTTTCTGTAGGAGTGATGAA 120
4-40 AAATGCATACTCGCAACCGATTGCAACAAACCCCTGGATGGTTTCTGTAGGAGTGATGAA 120
4-62 AAATGCATACTCGCAACCGATTGCAACAAACCCCTGGATGGTTTCTGTAGGAGTRATGAA 120
***** *****

3-1 GCBATCCTTGTTCCGGTCGAAAAAGGAGACATGTTTCTGAAGCTCCGTCATGTTTGCAGG 180
3-41 GCCATCCTTGTTCCGGTCGAAAAAGGAGACATGTTTCTGAAGBTCCGTCATGTTTGCAGG 180
4-40 GCCATCCTTGTTCCGGTCGAAAAAGGAGACATGTTTCTGAAGCTCCGTCATGTTTGCAGG 180
4-62 GCCATCCTTGTTCCGGTCGAAAAAGGAGACATGTTTCTGAAGCTCCGTCATGTTTGCAGG 180
** *****

3-1 ATCAAACCTTGCCACGGCATGCCCCCAGTTCCAGCTAAAGATCCACAGAAGCAGAAGAGA 240
3-41 ATCAAACCTTGCCACGGCATGCCCCCAGTTCCAGCTAAAGATCCACAGAAGCAGAAGAGA 240
4-40 ATCAAACCTTGCCACGGCATGCCCCCAGTTCCAGCTAAAGATCCACAGAAGCAGAAGAGA 240
4-62 ATCAAACCTTGCCACGGCATGCCCCCAGTTCCAGCTAAAGATCCACAGAAGCANAAGAGA 240
*****

3-1 TGGTAGCTTCAGAGAAGCCGCTGCCAGCGATTGTBGATGACCGGGCATTGTCGCCTGTAG 300
3-41 TGGTAGCTTCAGAGAAGCCGCTGCCAGCGATTGTTCGATGACCGGGCATTGTCGCCTGTAG 300
4-40 TGGTAGCTTCAGAGAAGCCGCTGCCAGCGATTGTTCGATGACCGGGCATTGTCGCCTGTAG 300
4-62 TGGTANCTTCAGAGAAGCCGCTGCCANCGATTGTTCGATGACCGGGCATTNTCGCCTGTAG 300
*****

3-1 CTATGATCCTGA 312
3-41 CTATGATC---- 308
4-40 CTATGATC---- 308
4-62 CTATNAT---- 307
**** **

```

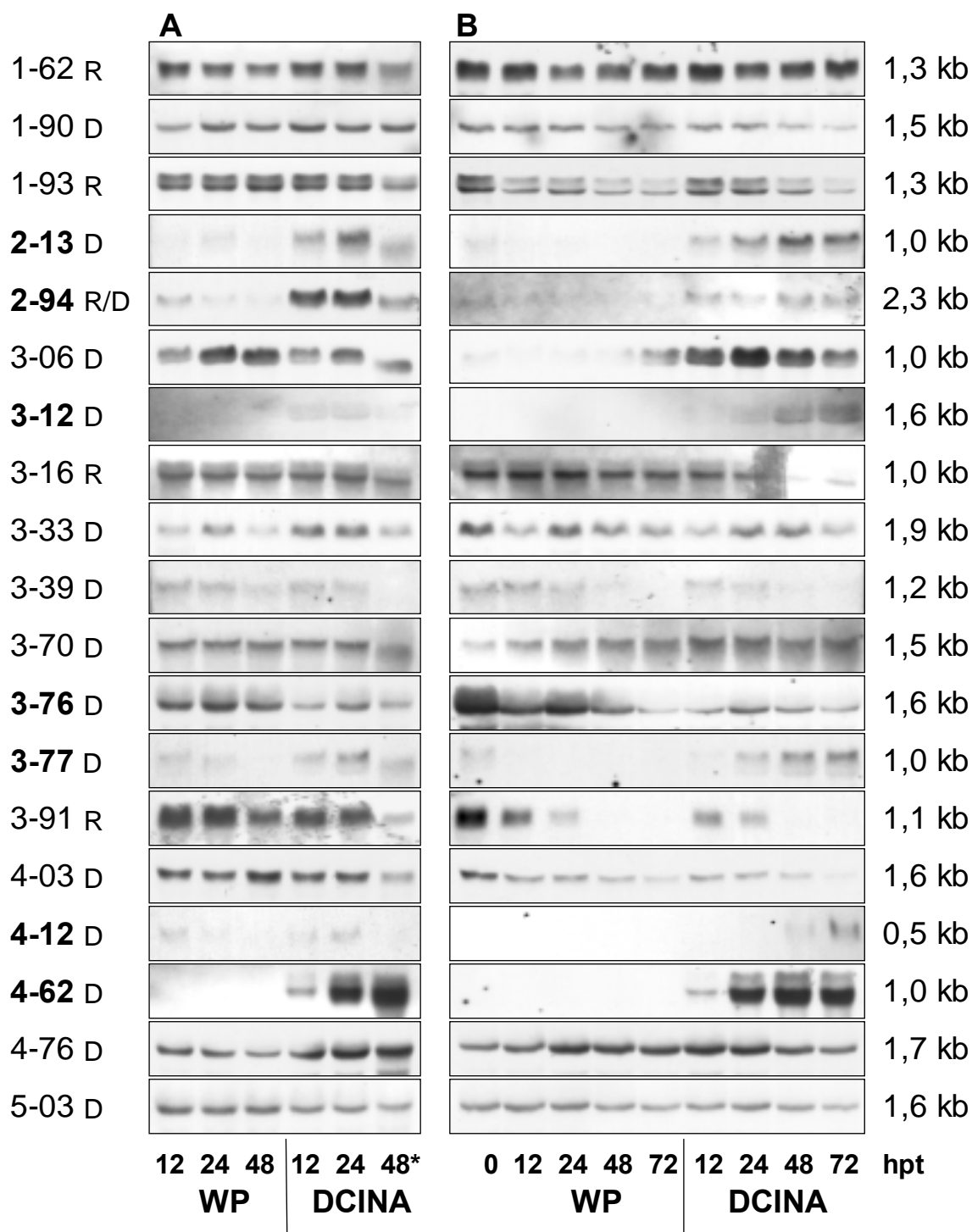


Abb. 8.4 Überprüfung der Transkriptakkumulation von 19 potentiell nach DCINA-Applikation differentiell exprimierter Gene (s. 3.3.1.1)

Fünf Tage alte Gerstenkeimlinge der Mutante A89 wurden mit 5 mg L⁻¹ DCINA bezogen auf das Bodenvolumen oder mit der Leerformulierung WP gegossen. Primärblätter wurden zu angegebenen Zeitpunkten (hpt) geerntet und Gesamt-RNA extrahiert. Nach gelelektrophoretischer Trennung (10 µg RNA pro Spur) wurde die Expression der potentiell differentiell exprimierten Gene in *Northern Blot*-Analysen untersucht. Die Hybridisierung erfolgte mit DNA(D)- oder RNA(R)-Sonden unter stringenten Bedingungen. Links sind die Klon-Nummern angegeben, rechts die jeweilige abgeschätzte Transkriptgröße (kb). **A** Kinetik des ersten, **B** des zweiten differentiellen Ansatzes. *RNA-Probe leicht degradiert. *Fortsetzung s. nächste Seite.*

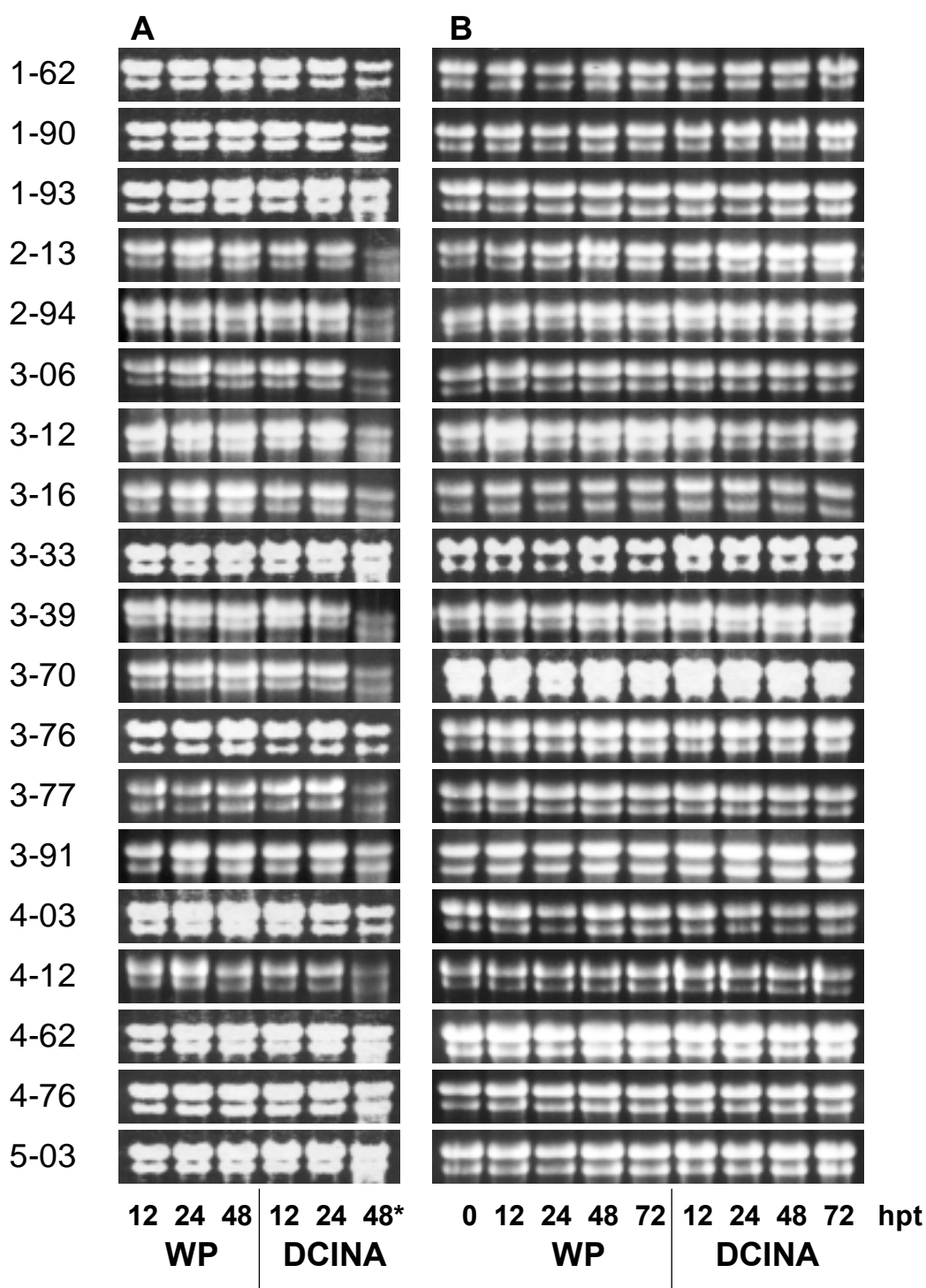


Abb. 8.4 Ethidiumbromidgele zu *Northern Blots* (s.o.).

Die gleichmäßige RNA-Beladung des Gels wurde anhand EtBr-vermittelter Fluoreszenz der ribosomalen RNA unter UV-Licht überprüft. *Probe leicht degradiert.

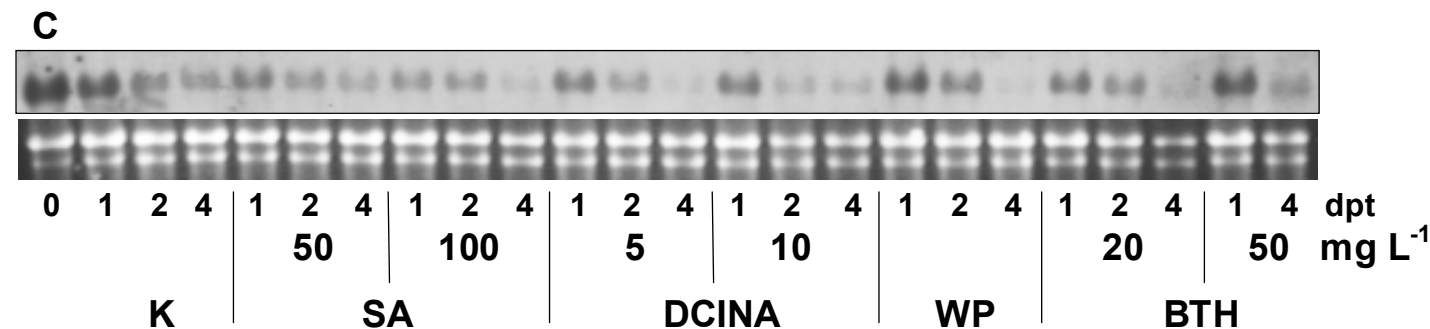
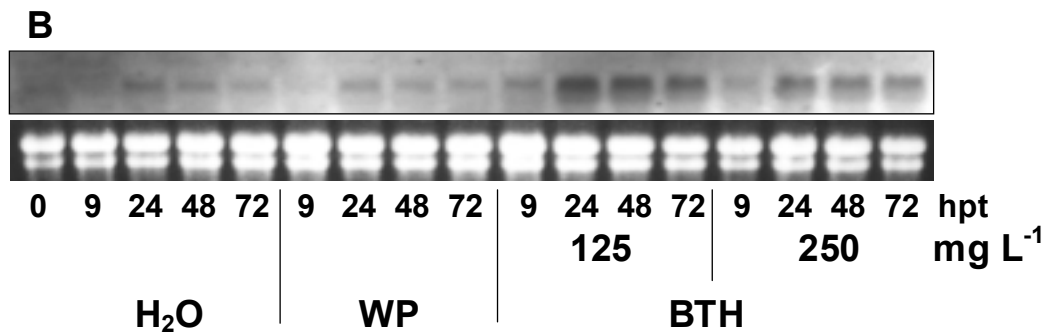
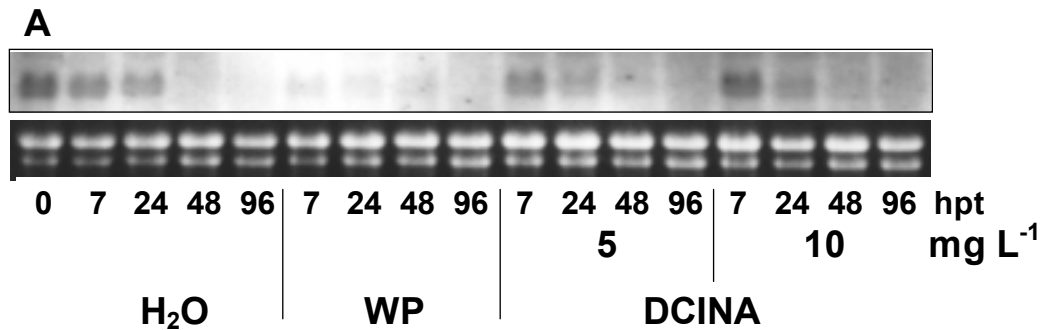


Abb. 8.5 Transkriptakkumulation von *Bci-5* nach chemischer Induktion mit SA, DCINA und BTH (s. 3.3.1.1).

A Sieben Tage alte Gerstenkeimlinge cv. Pallas wurden mit 5 und 10 mg L⁻¹ DCINA bezogen auf das Bodenvolumen, der Leerformulierung WP, oder Wasser (H₂O) gegossen. **B** Sechs Tage alte Gerstenkeimlinge cv. Ingrid wurden mit 125 oder 250 mg L⁻¹ BTH, der Leerformulierung WP, oder Wasser (H₂O) besprüht. **C** Sechs Tage alte Gerstenkeimlinge cv. Ingrid wurden mit 50 und 100 mg L⁻¹ SA, 5 und 10 mg L⁻¹ DCINA und 20 und 50 mg L⁻¹ BTH jeweils bezogen auf das Bodenvolumen gegossen. Kontroll-behandlung erfolgte durch Gießen einer 1 %igen DMF- (SA, DCINA) bzw. WP-Lösung (BTH). Primärblätter der Gerstenpflanzen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten (hpt, dpt) geerntet und Gesamt-RNA extrahiert. Nach gelelektrophoretischer Trennung (A 9 µg, B 8,25 µg und C 5 µg RNA pro Spur) und Herstellung von *Northern Blots* wurde die mRNA mit Fluorescein- oder Digoxigenin-markierten Transkriptsonden von *Bci-5* unter stringenten Bedingungen hybridisiert. Die gleichmäßige RNA-Beladung des Gels wurde anhand EtBr-vermittelter Fluoreszenz der ribosomalen RNA unter UV-Licht überprüft. Vergleiche auch Abb. 3.3. Die resistenzinduzierende Wirkung wurde jeweils durch Inokulation mit *BghA6* und anschließender Auswertung der Bildung von Mehltaukolonien überprüft.

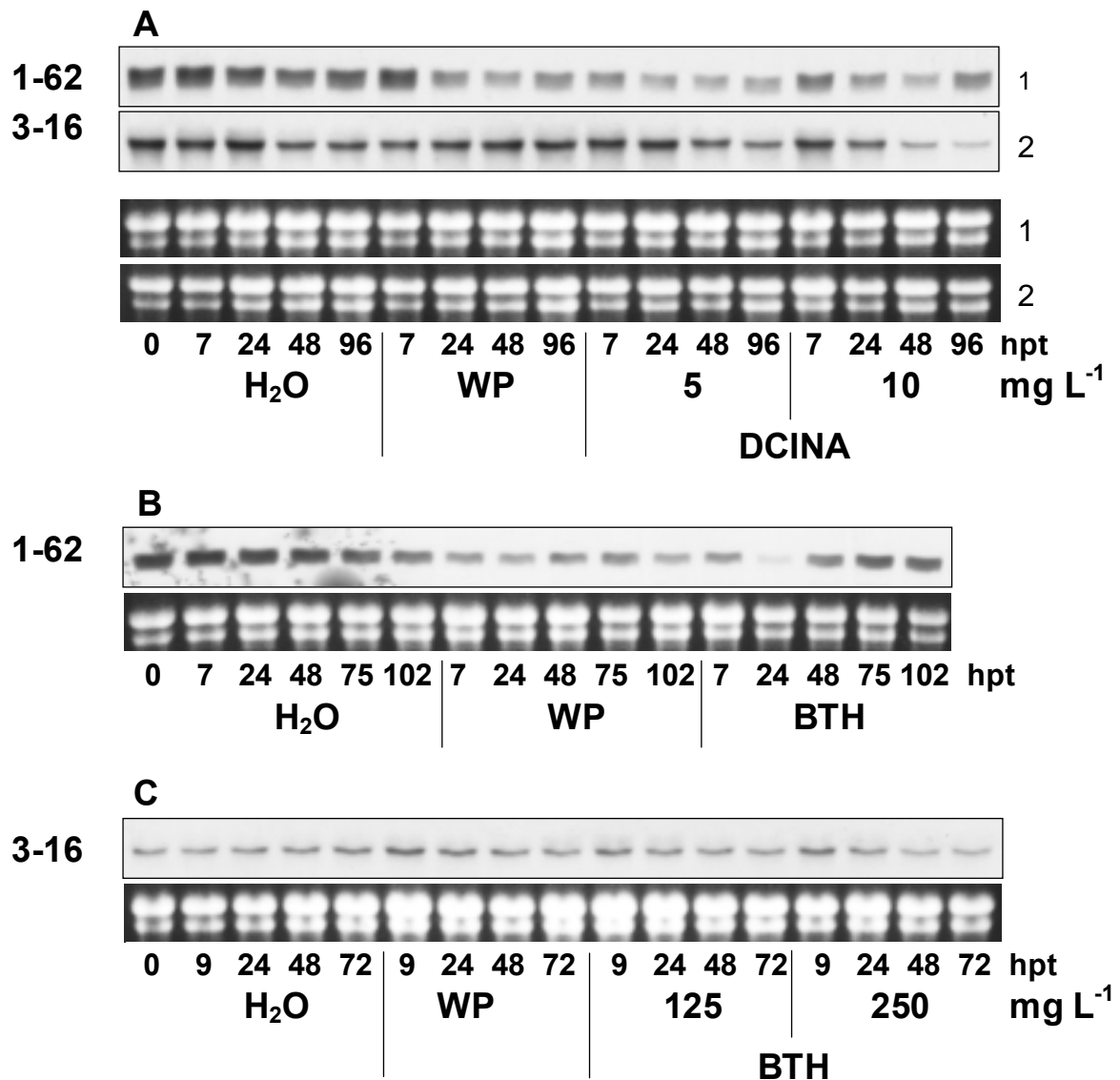


Abb. 8.6 Transkriptakkumulation von Klon 1-62 und 3-16 in verschiedenen Gerstensorten nach chemischer Induktion mit DCINA und BTH (s. 3.3.1.1).

A Sieben Tage alte Gerstenkeimlinge cv. Pallas wurden mit 5 und 10 mg L⁻¹ DCINA bezogen auf das Bodenvolumen, mit der Leerformulierung WP oder Wasser (H₂O) gegossen. **B** Sieben Tage alte Gerstenkeimlinge cv. Manchuria wurden mit 250 mg L⁻¹ BTH, mit der Leerformulierung WP, oder Wasser (H₂O) besprüht. **C** Sechs Tage alte Gerstenkeimlinge cv. Ingrid wurden mit 125 oder 250 mg L⁻¹ BTH, mit der Leerformulierung WP oder Wasser (H₂O) besprüht. Primärblätter der Gerstenpflanzen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten (hpt) geerntet und Gesamt-RNA extrahiert. Nach gelelektrophoretischer Trennung (A und C 9 µg, B 10 µg RNA pro Spur) und Herstellung von *Northern Blots* wurde die mRNA mit Transkriptsonden der cDNA-Klone 1-62 und 3-16 unter stringenten Bedingungen hybridisiert. Die gleichmäßige RNA-Beladung des Gels wurde anhand EtBr-vermittelter Fluoreszenz der ribosomalen RNA unter UV-Licht überprüft. Ziffern rechts neben den Filmen und Gelen geben jeweils den zugehörigen *Blot* an. Die resistenzinduzierende Wirkung der Behandlung wurde jeweils durch Inokulation mit *BghA6* und anschließender Auswertung der Bildung von Mehltaukolonien überprüft.

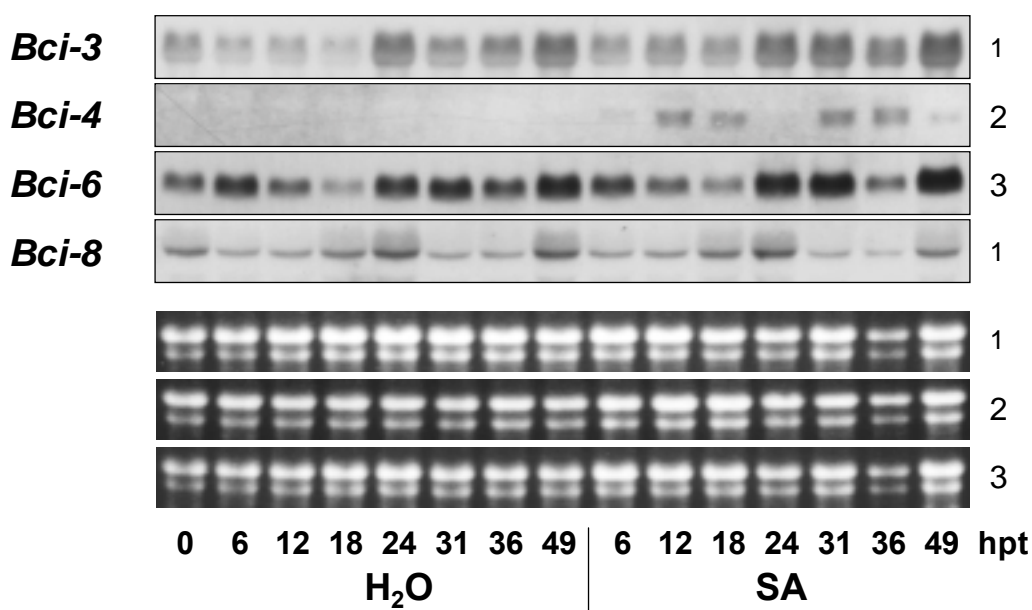


Abb. 8.7 Transkriptakkumulation der *Bci*-Gene nach SA-Applikation (s. 3.3.1.3).

Sieben Tage alte Gerstenkeimlinge cv. Ingrid wurden mit 100 mg L^{-1} SA bezogen auf das Bodenvolumen oder mit Wasser (H_2O) gegossen. Primärblätter der Gerstenpflanzen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten (hpt) geerntet und Gesamt-RNA extrahiert. Nach gelelektrophoretischer Trennung ($9\text{-}10 \text{ }\mu\text{g}$ RNA pro Spur) und Herstellung von *Northern Blots* wurde die mRNA mit Transkript- oder DNA-Sonden von *Bci-1* bis *Bci-9* unter stringenten Bedingungen hybridisiert. Die gleichmäßige RNA-Beladung des Gels wurde anhand EtBr-vermittelter Fluoreszenz der ribosomalen RNA unter UV-Licht überprüft. Ziffern rechts neben den Filmen und Gelen geben jeweils den zugehörigen *Blot* an. Es sind nur die Ergebnisse der *Bci*-Gene dargestellt, die nach SA-Applikation differentiell exprimiert waren.

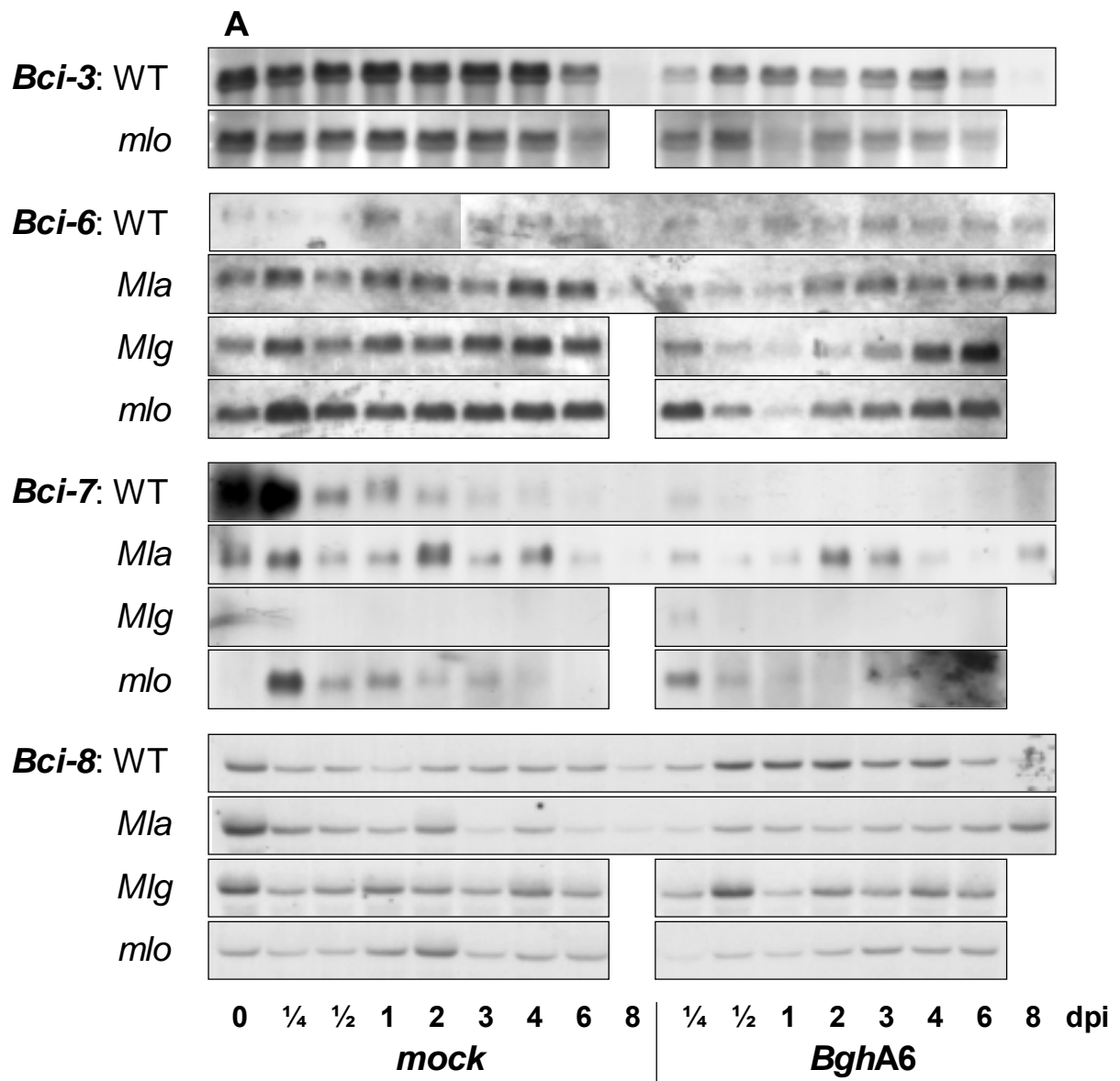


Abb. 8.8 Transkriptakkumulation der *Bci*-Gene in Interaktionen verschieden resistenter Gerstenlinien mit *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* (s. 3.3.4.1.1).

A Sieben Tage alte Gerstenpflanzen cv. Ingrid (suszeptibel, WT) und der resistenten nahezu isogenen Rückkreuzungslinien *BCIngrid-Mla12* (*Mla*), *BCIngrid-Mlg* (*Mlg*) und *BCIngrid-mlo5* (*mlo*) wurden mit *BghA6* inokuliert (*Bgh*), bzw. *mock*-behandelt. Blattproben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten nach Inokulation (dpi) entnommen und Gesamt-RNA extrahiert. Nach gelelektrophoretischer Trennung (9-10 µg RNA pro Spur) und Herstellung von *Northern Blots* wurde die mRNA mit Sonden von *Bci-3* (nur WT und *mlo*) bis *Bci-9* unter stringenten Bedingungen hybridisiert. Die gleichmäßige RNA-Beladung des Gels wurde anhand EtBr-vermittelter Fluoreszenz der ribosomalen RNA unter UV-Licht überprüft (**B**, s. nächste Seite).

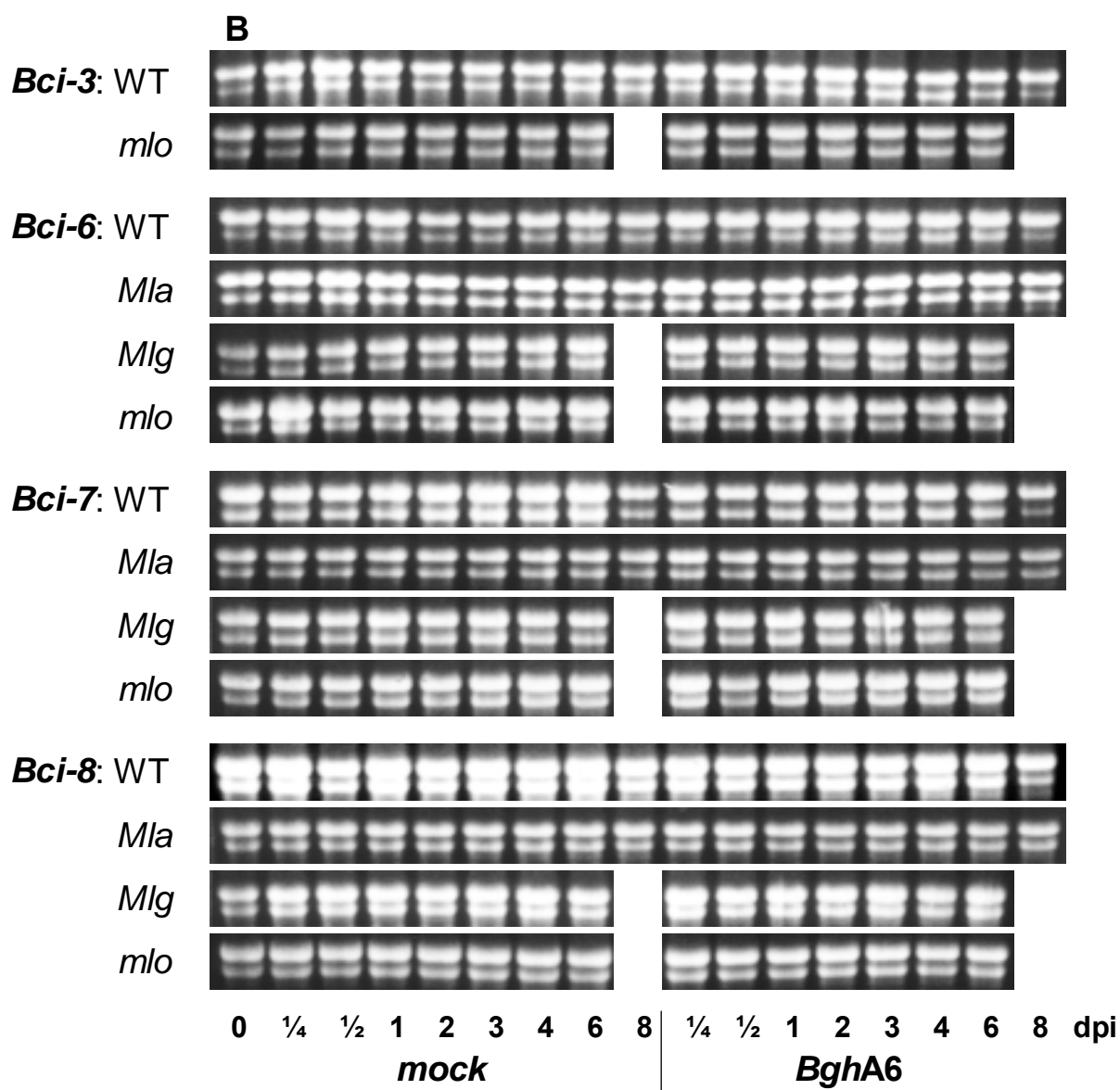


Abb. 8.8 Ethidiumbromidgele für *Northern Blots* in Abb 8.8 A. *Legende s. vorherige Seite.*

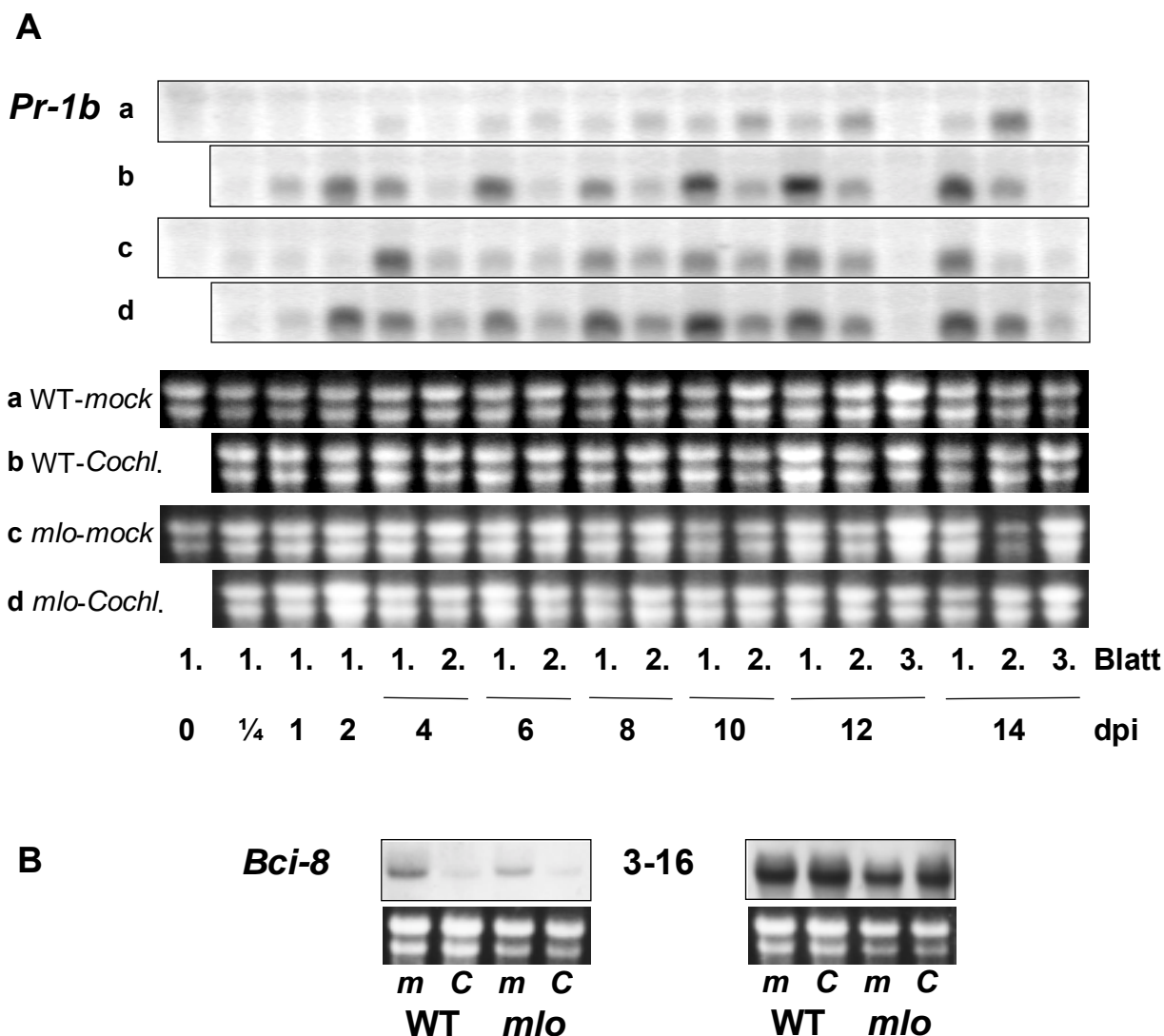


Abb. 8.9 Transkriptakkumulation der *Bci*-Gene im Vergleich zu *Pr-1b* nach Inokulation mit *Cochliobolus sativus* (s. 3.3.4.2).

A Sieben Tage alte Gerstenpflanzen cv. Ingrid (WT, **a** und **b**) und der nahezu isogenen Rückkreuzungslinie *BCIngrid-mlo5* (*mlo*, **c** und **d**) wurden mit *Cochliobolus sativus* (*Cochl.*, **b** und **d**), bzw. *mock*-inokuliert (*mock*, **a** und **c**). Blattproben (unterschieden in 1., 2. und 3. Blatt) wurden zu den angegebenen Zeitpunkten nach Inokulation (hpi, bzw. dpi) entnommen und Gesamt-RNA extrahiert. Nach gelelektrophoretischer Trennung (10 µg RNA pro Spur) und Herstellung von *Northern Blots* wurde die mRNA mit radioaktiv markierten Sonden von *Bci-1* bis *Bci-9* und *Pr-1b* unter stringenten Bedingungen hybridisiert. **B** Primärblattsegmente sieben Tage alter Gerstenpflanzen cv. Ingrid (WT) und *BCIngrid-mlo5* (*mlo*) wurden mit *Cochliobolus sativus* (C), bzw. *mock*-inokuliert (m). Blattproben wurden 9 dpi entnommen und *Northern Blot*-Analysen unterzogen (9 µg RNA pro Spur). Die mRNA wurde mit Sonden von *Bci-4* bis *Bci-9* unter stringenten Bedingungen hybridisiert. Die gleichmäßige RNA-Beladung des Gels wurde anhand EtBr-vermittelter Fluoreszenz der ribosomalen RNA unter UV-Licht überprüft. Es sind jeweils nur die Ergebnisse der *Bci*-Gene dargestellt, die nach Inokulation differentiell exprimiert waren.

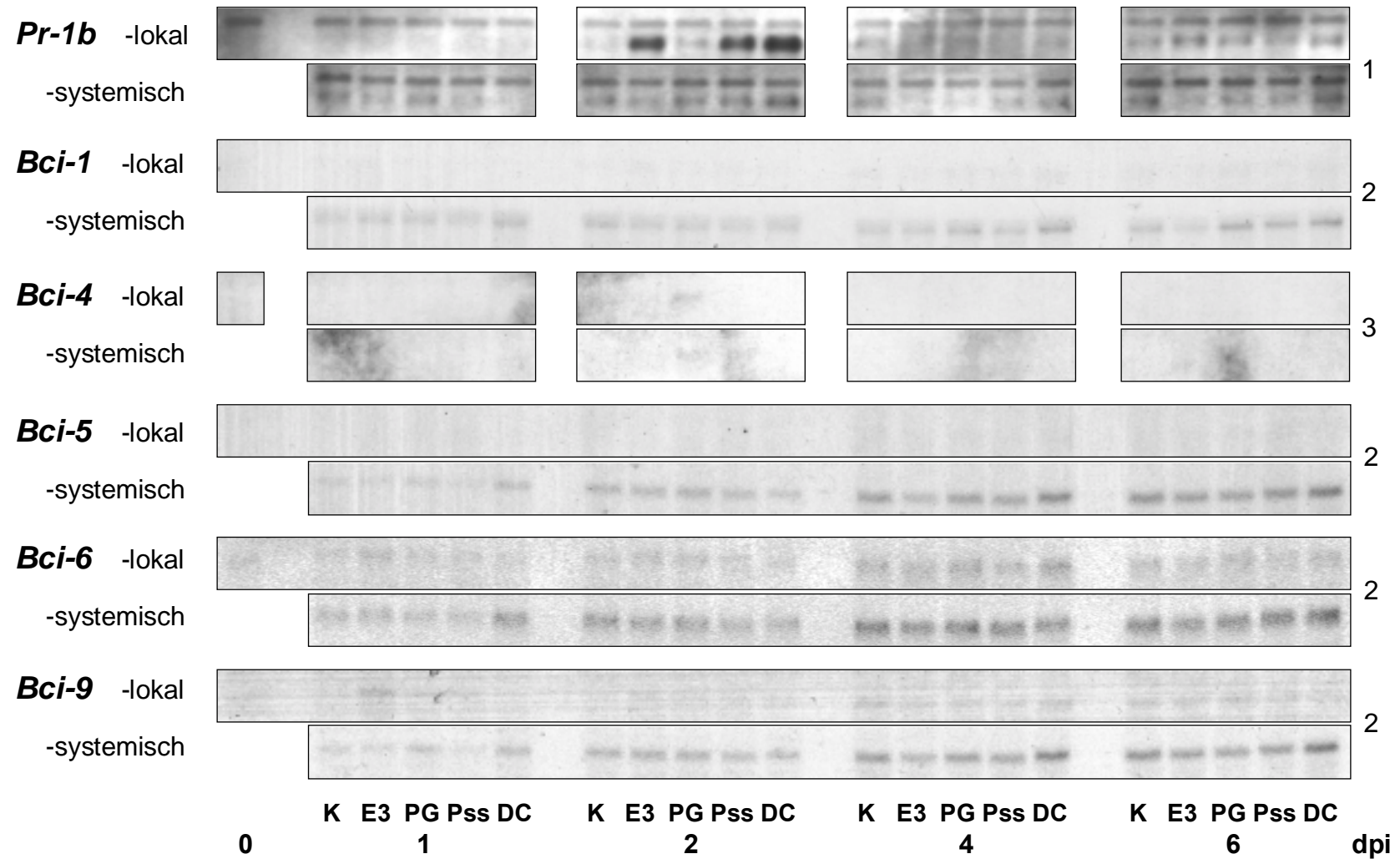


Abb. 8.10 Transkriptakkumulation der *Bci*-Gene und *Pr-1b* nach Infiltration verschiedener Bakterien. *Legende s. nächste Seite.*

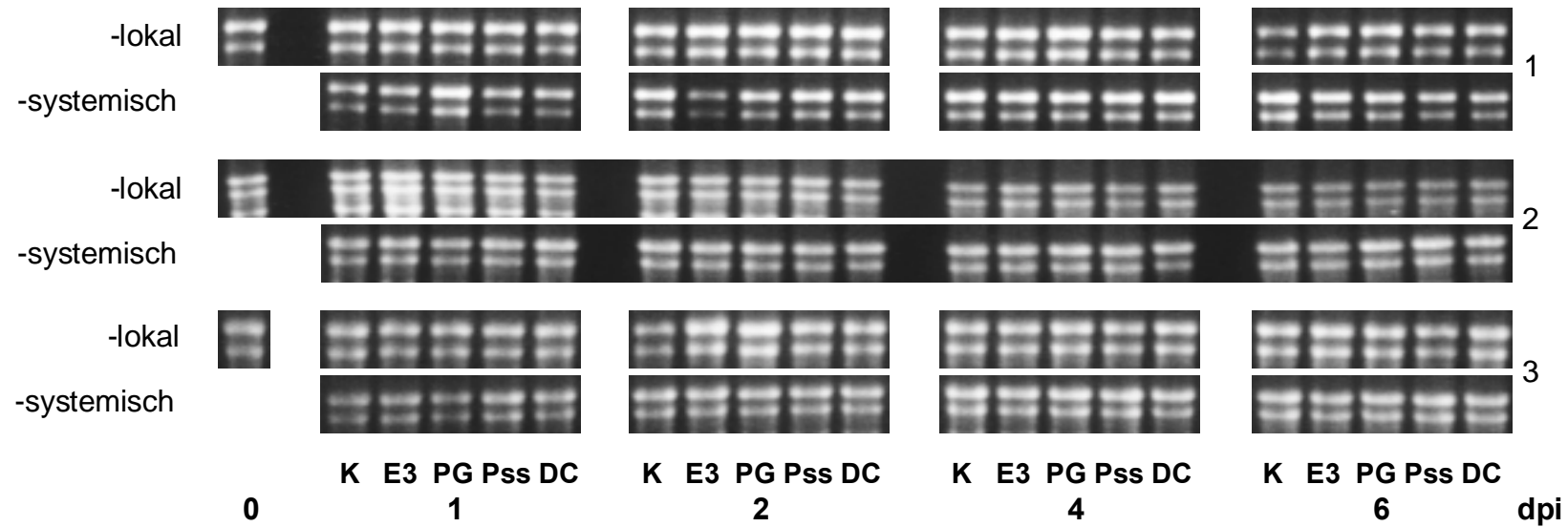


Abb. 8.10 Transkriptakkumulation der *Bci*-Gene und *Pr-1b* nach Infiltration verschiedener Bakterien (s. 3.3.4.5).

A Primärblätter sieben Tage alter Gerstenkeimlinge cv. Ingrid wurden mit Suspensionen von *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (DC), *P.s.* pv. *syringae* (Pss), *P.s.* pv. *glycinea* (PG), einem selbst isolierten Bakterium (*Paenibacillus polymyxa*, E3), bzw. mit Infiltrationsmedium 5 mM MgSO_4 (K) infiltriert. Nach 1, 2, 4 und 6 dpi wurden Proben des infiltrierten Primär- (lokal) und des nicht-infiltrierten Sekundärblattes (systemisch) entnommen. Nach Extraktion von Gesamt-RNA, gelelektrophoretischer Trennung (1: 2 μg , 2 und 3: 10 μg RNA pro Spur) und Herstellung von *Northern Blots* wurde die mRNA mit Fluorescein- oder Digoxigenin-markierten Sonden von *Pr-1b* und *Bci-4*, bzw. mit radioaktiv markierten Sonden aller anderen *Bci*-Gene unter stringenten Bedingungen hybridisiert. **B** Die gleichmäßige RNA-Beladung des Gels wurde anhand EtBr^- -vermittelter Fluoreszenz der ribosomalen RNA unter UV-Licht überprüft. Ziffern rechts neben den

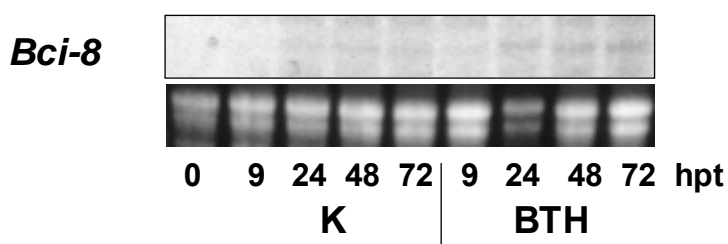


Abb. 8.11 Transkriptakkumulation eines *Bci-8* Homologen aus Reis nach BTH-Applikation (s. 3.3.6.2).

Vierzehn Tage alte Reispflanzen cv. Kusabue wurden mit 250 mg L⁻¹ BTH (BTH) oder zur Kontrolle mit der Leerformulierung WP (K) besprüht. Behandelte Blätter wurden zu den angegebenen Zeitpunkten (hpt) geerntet und Gesamt-RNA extrahiert. Nach gelelektrophoretischer Trennung (10,5 µg RNA pro Spur) und Herstellung von *Northern Blots* wurde die mRNA mit Sonden von *Bci-2* bis *Bci-9* bei 60 °C hybridisiert. Die gleichmäßige RNA-Beladung des Gels wurde anhand EtBr-vermittelter Fluoreszenz der ribosomalen RNA unter UV-Licht überprüft. Es sind jeweils nur die Ergebnisse der *Bci*-Gene dargestellt, die nach Induktion differentiell exprimiert waren.

Abb. 8.12 Alignment der vier 3'-RACE-Klone von *Bci-4* und deren Konsensussequenz (s. 3.4.1).

3'R-4_	GTGGATCTTTAGCTGGRACCTGGGGGCATGCCGTGGCCAAGTTTGATCCTGCAAACATGAC	60
3'R-1_	GTGGATCTTTAGCTGGAACCTGGGGGCATGCCGTGGCCAAGTTTGATCCTGCAAACATGAC	60
3'R-3_	GTGGATCTTTAGCTGGAACCTGGGGGCATGCCGTGGCCAAGTTTGATCCTGCAAACATGAC	60
3'R-2_	KTGGGMMCTTTDCGGGRAACGGGGGAAY-CCGGGSCAAARTTTAWCYSRAAAAAAARAG	59
	*** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
3'R-4_	GGAGCTTCAGARACATGTCTCCTTTTTTCGACCGGAACAAGGATGGCTTCATCACTCCTAC	120
3'R-1_	GGAGCTTCAGAAAACATGTCTCCTTTTTTCGACCGGAACAAGGATGGCTTCATCACTCCTAC	120
3'R-3_	GGAGCTTCAGAAAACATGTCTCCTTTTTTCGACCGGAACAAGGATGGCTTCATCACTCCTAC	120
3'R-2_	GGAGHCTAAAAAAAATCCCCCTTTTTSVCCSGGAAAAAGGAGGGCTYMACCACCACAC	119
	**** *	
3'R-4_	AGARACCA-TCCAAGGGTTTGTGTGCAATCGGTTGCGAGTATGCATTT--GCTACTGCTGC	177
3'R-1_	AGAAAACCA-TCCAAGGGTTTGTGTGCAATCGGTTGCGAGTATGCATTT--GCTACTGCTGC	177
3'R-3_	AGAAAACCA-TCCAAGGGTTTGTGTGCAATCGGTTGCGAGTATGCATTT--GCTACTGCTGC	177
3'R-2_	ARAAACWCCTCCAAGGGKTTGTKGMAAYSGGKTGGGGGKAGGSAWTTTTGCWACTGYKCC	179
	* *	
3'R-4_	CTCTGCCGCCATTCA-CGGTGCCCTTGCTCCTCAAACAACCCCGGCTGGTACACCACCTGC	236
3'R-1_	CTCTGCCGCCATTCA-CGGTGCCCTTGCTCCTCAAACAACCCCGGCTGGTACACCACCTGC	236
3'R-3_	CTCTGCCGCCATTCA-CGGTGCCCTTGCTCCTCAAACAACCCCGGCTGGTACACCACCTGC	236
3'R-2_	TTCTGCCGCMWTTTCATSGGTCCCTTKGCCCYTMAAMAMCCCCGGCTGGWMCCCCACTCC	239
	***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
3'R-4_	CTCACTTGACAATATACGTAGAGAATATCCA-CAAAGCTATGCATGGAAGTGATTTCAGGT	295
3'R-1_	CTCACTTGACAATATACGTAGAGAATATCCA-CAAAGCTATGCATGGAAGTGATTTCAGGT	295
3'R-3_	CTCACTTGACAATATACGTAGAGAATATCCA-CAAAGCTATGCATGGAAGTGATTTCAGGT	295
3'R-2_	CTCACTKGACAATATACGTAGAGAATAYCCAACAARGCTATGCATGGAAGKGWTYCRGGK	299
	***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	

3'R-4_	GTATATGATGCCAAAGGAAGGTTTCTTCCCCAAAAC'TTTGAGGAATTATTCAAACATAT	355
3'R-1_	GTATATGATGCCAAAGGAAGGTTTCTTCCCCAAAAC'TTTGAGGAATTATTCAAACATAT	355
3'R-3_	GTATATGATGCCAAAGGAAGGTTTCTTCCCCAAAAC'TTTGAGGAATTATTCAAACATAT	355
3'R-2_	KTATATGAKSCCAARGGAGGGTTTCTCCCCAAAAC'TTTGAGGAATTATTCAAACATAT	359

3'R-4_	GCAATACTCCGACCAGATGCGTTGACTCTTGCGGAGATGCATGTGATGCTCTTTGCAAAA	415
3'R-1_	GCAATACTCCGACCAGATGCGTTGACTCTTGCGGAGATGCATGTGATGCTCTTTGCAAAA	415
3'R-3_	GCAATACTCCGACCAGATGCGTTGACTCTTGCGGAGATGCATGTGATGCTCTTTGCAAAA	415
3'R-2_	GCAATACTCCGMCCAGATGCGTTGACTCTTGCGGAGATGCATGTGATGCTCTTTGCAAAA	419

3'R-4_	CGGGATCTAGACCCTATATCATGGGCACCACCACAGGTTGAGTGGGGCCTATTATTCACG	475
3'R-1_	CGGGATCTAGACCCTATATCATGGGCACCACCACAGGTTGAGTGGGGCCTATTATTCACG	475
3'R-3_	CGGGATCTAGACCCTATATCATGGGCACCACCACAGGTTGAGTGGGGCCTATTATTCACG	475
3'R-2_	CGGGATCTAGACCCTATATCATGGGCACCACCACAGGTTGAGTGGGGCCTATTATTCACG	479

3'R-4_	CTTGCAAGCGATTGGCTTGGGTTCCCTTCACAAAGACAGTGTTAGAGGTATATATGATGGA	535
3'R-1_	CTTGCAAGCGATTGGCTTGGGTTCCCTTCACAAAGACAGTGTTAGAGGTATATATGATGGA	535
3'R-3_	CTTGCAAGCGATTGGCTTGGGTTCCCTTCACAAAGACAGTGTTAGAGGTATATATGATGGA	535
3'R-2_	CTTGCAAGCGATTGGCTTGGGTTCCCTTCACAAAGACAGTGTTAGAGGTATATATGATGGA	539

3'R-4_	AGCCTGTTTATCAAGTTGGAAAAGAAATGGCACCC'TTTTCAAAGTGCTATGCGATGAAC	595
3'R-1_	AGCCTGTTTATCAAGTTGGAAAAGAAATGGCACCC'TTTTCAAAGTGCTATGCGATGAAC	595
3'R-3_	AGCCTGTTTATCAAGTTGGAAAAGAAATGGCACCC'TTTTCAAAGTGCTATGCGATGAAC	595
3'R-2_	AGCCTGTTTATCAAGTTGGAAAAGAAATGGCMCCCTTTTCAAAGTGCTATGCGATGAAC	599

3'R-4_	TGGTGCTAGTTTAGAGTGAGAGTTTGGATATGGAAAGGKTTGTCCCAGAAGAAGGTTT-CC	654
3'R-1_	TGGTGCTAGTTTAGAGTGAGAGTTTGGATATGGAAAGGKTTGTCCCAGAAGAAGGTTTCC	655
3'R-3_	TGGTGCTAGTTTAGAGTGAGAGTTTGGATATGGAAAGGKTTGTCCCAGAAGAAGGTTTCC	655
3'R-2_	TGGTGCTAGTTTAGAGTGAGAGTTTGGGAAAGGGAAAGGTTGGCCCCAGAAGAAGGTTTCC	659

3'R-4_	TGCTATCTCCAAATTCAACTAGAGTTTATTTTCTTTTCCCTCCAAGTTGTAATTGGSTTTA	714
3'R-1_	TGCTATCTCCAAATTCAACTAGAGTTTATTTTCTTTTCCCTCCAAGTTGTAATTGGCTTTA	715
3'R-3_	TGCTATCTCCAAATTCAACTAGAGTTTATTTTCTTTTCCCTCCAAGTTGTAATTGGSTTTA	715
3'R-2_	KGCTATCCCCAAATTCAACTAGAGTTTATTKTCTTTYCCYCCAAGTKGTAATKGGCTTTA	719

3'R-4_	TAARACCT-CATAGCCGATCAWW-CAACGA-GCAAGTKGRTATWAAAWHAAAAAAAAAAAA	771
3'R-1_	TAAGACCTTCATAGCCGATCAATACAACGAAGCAAGTTGGATGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	775
3'R-3_	TAAGACCTTCATAGCCGATCAATACAACGAAGCAAGTTGGRAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	775
3'R-2_	TAAGACCTTCATAGCCGATCAATACAACGAAGCAAGTTGGATATATTTCCCGACCTTGTA	779

3'R-4_	AAAAAAAAAAAAARSSGSCSK-----	791
3'R-1_	AAAAAAAAAAAAA-----	787
3'R-3_	AARCGCCGCGCKGA-----	791
3'R-2_	TTCTCTCATGKGCCCTTATTATGTTTGCGCCATGAGCGCCTACCCAAGAKGAGCCAT	839
3'R-4_	-----	
3'R-1_	-----	
3'R-3_	-----	
3'R-2_	AAGCATAAGGCTCATCCACCTATTGGCCACGACTACTGTTGGAAATATTCCCTACAKGCA	899
3'R-4_	-----	
3'R-1_	-----	
3'R-3_	-----	
3'R-2_	ATATTGKGAKGAWAAWATTTATCTATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	955

Konsensussequenz aller 3'-RACE-Klone von *BciI-4*:

Primer gsp2 und Stopcodon TGA in fetten Buchstaben dargestellt, 3'-Ende von Klon 2 unterstrichen.

```

gTGGatcttTtagCtGGaActGGGGGcAtgCCGtGgCcAAgTTTgatcctgcAAAcAtgAc : 60
GGAGctTcAgAaAcAtgTcTCTTTTTCgaCcGGAAcAAGGAtGGCTtcAtCACTCctAC : 120
AgAaACCaTCCAAGGGtTTGTtGcAAtcGGtTgCgAGtAtGcAtTTGCTACTGctgCcTC : 180
TGCCGCcaTTCaCGGTgCCcTtGCTCcTcAAAcAaCCCCGGCTGGtaCaCCACTgCCTCA : 240
CTtGACAATATACGTAGAGAATAtCCACAAaGCTATGCATGGAAGtGaTtCaGGtgTATA : 300
TGAtgCCAAaGGAaGGTTTCTtCCCCAAAACCTTTGAGGAATTATTCAAAACATATGCAAT : 360
ACTCCGaCCAGATGCGTTGACTCTTGCGGAGATGCATGTGATGCTCTTTGCAAAACGGGA : 420
TCTAGACCCTATATCATGGGCACCACCACAGGTTGAGTGGGGCCTATTATTACGCTTGC : 480
AAGCGATTGGCTTGGGTTCTTTCACAAAGACAGTGTAGAGGTATATATGATGGAAGCCT : 540
GTTTATCAAGTTGAAAAAGAAATGGCaCCCTTTTCAAAGTGCTATGCGATGAACTTGGTG : 600
CTAGTTTAGAGTGAGAGTTtGGAtAtGGAAAGGtTtGtCCCGAAGAAGGTTTtCCTGCTA : 660
TCTCCAAATTCAACTAGAGTTTATTtTCTTTtCCtCCAAGTtGTAAttGGcTTTATAAgA : 720
CCTtCATAGCCGATCAataCAACGAaGCAAGTtGgAtAtATTTCCCGACCTTGTATTCTC : 780
TCTCATGKGGCCCTTATTAtGTTTGCGCCAtGaGCGCCTACCCAAGAKGaGCCAtAAGCA : 840
tAAGGcTCATCCaCCtATTGGCCaCGACTACTGTTGGAAAtATtCCctACAKGCAAtATT : 900
GKGAKGAWAAWAtTtATCtAtAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA : 950

```

Abb. 8.13 Alignment der drei Klone des ersten 5'-RACE-Experimentes von *Bci-4* und deren Konsensussequenz (s. 3.4.1).

```

5'R-6_  --CGGTCATCGACAATCGCTGGCAGCGGCTTCTCTGAAGCTACCATCTCTTCTGCTTCTG  58
5'R-10_ CCCGGTCATCGACAATCGCTGGCAGCGGCTTCTCTGAAGCTACCATCTCTTCTGCTTCTG  60
5'R-9_  -----CGACAATCGCTGGCAGCGGCTTCTCTGAAGCTACCATCTCTTCTGCTTCTG  51
          *****

5'R-6_  TGGATCTTTAGCTGGAAGTGGGGGCATGCCGTGGCCAAGTTTGATCCTGCAAACATGACG  118
5'R-10_ TGGATCTTTAGCTGGAAGTGGGGGCATGCCGTGGCCAAGTTTGATCCTGCAAACATGACG  120
5'R-9_  TGGATCTTTAGCTGGAAGTGGGGGCATGCCGTGGCCAAGTTTGATCCTGCAAACATGACG  111
          *****

5'R-6_  GAGCTTCAGAAACATGTCTCCTTTTTCGACCGGAACAAGGATGGC  163
5'R-10_ GAGCTTCAGAAACATGTCTCCTTTTTCGACCGGAACAAGGATGGC  165
5'R-9_  GAGCTTCAGAAACATGTCTCCTTTTTCGACCGGAACAAGGATGGC  156
          *****

```

Konsensussequenz aller Klone des ersten 5'-RACE-Experiments von *Bci-4*:

Zu Primer ngsp1 komplementäre Sequenz in fetten Buchstaben dargestellt.

```

CCCGGTCATC GACAATCGCT GGCAGCGGCT TCTCTGAAGC TACCATCTCT TCTGCTTCTG  60
TGGATCTTTA GCTGGAAGT GGGGCATGCC GTGGCCAAGT TTGATCCTGC AAACATGACG  120
GAGCTTCAGA AACATGTCTC CTTTTTCGAC CGGAACAAGG ATGGC 165

```

4-62_	TCAGGATCATAGCTACAGGCGACAATGCCCGGTCATCGACAATCGCTGGCAGCGGGCTTCT	60
5'R2-3_	-----ATAGCTACAGGCGACAATGCCCGGTCATCGACAATSGCTGGCAGCGGGCTTCT	52
5'R1-k_	-----CCCGGTCATCGACAATCGCTGGCAGCGGGCTTCT	33
5'R2-2_	-----CGACAATCGCWGGCAGCGGCAACA	24
	tcaggatc ATAG CTACAGGCGACA ATG CCCGGTCATCGACAATcGctGGCAGCGGGcttCt	
4-62_	CTGAAGCTACCATCTCTTCTGCTTCTGTGGATCTTTAGCTGGAACGGGGGCATGCCGTG	120
5'R2-3_	CTGAAGCTACCATCTSTTCTGCTTCTGTGGATCTTTAGCTGGAACGGGGGCATGCCGTG	112
5'R1-k_	CTGAAGCTACCATCTCTTCTGCTTCTGTGGATCTTTAGCTGGAACGGGGGCATGCCGTG	93
5'R2-2_	CTGAAGCKACCAKCRCTDCDGCCTCDGTGGATCKKKAGCTGGAACAGGGGGCATGCMGTG	84
	CTGAAGCtACCAAtCtCtTtCtGCTtCtGTGGATCtttAGCTGGAACtGGGGGCATGCcGTG	
4-62_	G-CCAAGTTTGATCCTGCAAACATGACGGAGCTTCAGAAACATGTCTCCTTTTTTCGACCG	179
5'R2-3_	G-CCAAGTTTGATCCTGCAAACATGACGGAGCTTCAGAAACATGTSTCCTTTTktcGACCG	161
5'R1-k_	G-CCAAGTTTGATCCTGCAAACATGACGGAGCTTCAGAAACATGTCTCCTTTTTTCGACCG	142
5'R2-2_	AACMAAGTTTGATCCWGCTWACATGACGGWGCTTCAGADACATGTCTCCTTTTTTCGaCCG	134
	g CcAAGTTTGATCCtGCaaACATGACGGaGCTTCAGAAaCATGTcTCct TTtTcGaCCG	
4-62_	GAACAAGGATGGCTTCATCACTCCTACAGAAACCATCCAAGGGTTTGTGCAATCGGTTG	239
5'R2-3_	GaACAAGGATGGC-----	-
5'R1-k_	GAACAAGGATGGC-----	-
5'R2-2_	GtaYWagGATGGC-----	-
	GaAcaAGGATGGC	
4-62_	CGAGTATGCATTTGCTACTGCTGCCTCTGCCGCCATTACGGTGCCCTTGCTCCTCAAAC	299
5'R2-3_	-----	-
5'R1-k_	-----	-
5'R2-2_	-----	-
4-62_	AACCCCGGCTGGT	312
5'R2-3_	-----	-
5'R1-k_	-----	-
5'R2-2_	-----	-

Abb. 8.14 *Alignment* des SSH-cDNA-Fragmentes von *Bci-4* (4-62) mit der Konsensussequenz des ersten (5'R1-k) und zwei Sequenzen des zweiten 5'-RACE-Ansatzes (5'R2-2 und 5'R2-3) (s. 3.4.1).

Stopcodon (TAG) *in frame* vor dem Startcodon (ATG) und Primer ngsp1 in fetten Buchstaben dargestellt.

TCAGGATCAT AGCTACAGGC GACA ATG CCC GGTCATCGAC AATCGCTGGC	50	stop/start
AGCGGCTTCT CTGAAGCTAC CATCTCTTCT GCTTCT GTGG ATCTTTAGCT	100	gsp2
GGA ACTGGGG GC ATGCCGTG GCCAAGTTTG ATCCTGCAAA CATGACGGAG	150	SSH-Fragm.
CTTCAGAAAC ATGTCTCCTT TTTCGACCGG AACAAGGATG GCTTCATCAC	200	ngsp1
TCCTACAGAA ACCATCCAAG GGTTTGTTGC AATCGGTTGC GAGTATGCAT	250	
TTGCTACTGC TGCCCTCGCC GCCATTACAG GTGCCCTTGC TCCTCAAACA	300	
ACCCCGGCTG GTACACCACT GCCTCACTTG ACAATATACG TAGAGAATAT	350	
CCACAAAGCT ATGCATGGAA GTGATTACAGG TGTATATGAT GCCAAAGGAA	400	
GGTTTCTTCC CAAAAACTTT GAGGAATTAT TCAAAACATA TGCAATACTC	450	
CGACCAGATG CGTTGACTCT TCGGAGATG CATGTGATGC TCTTTGCAAA	500	
ACGGGATCTA GACCCTATAT CATGGGCACC ACCACAGGTT GAGTGGGGCC	550	
TATTATTCAC GCTTGCAAGC GATTGGCTTG GGTTCCCTTCA CAAAGACAGT	600	
GTTAGAGGTA TATATGATGG AAGCCTGTTT ATCAAGTTGG AAAAGAAATG	650	
GCACCCTTTT CAAAGTGCTA TGCGAT TGA AC TTGGTGCTAG TTTAGAGTGA	700	stop
GAGTTtGGAt AtGGAAAGGt TtGtCCCGAA GAAGGTTTtC CtGCTATCtC	750	
CAAATTCAAC TAGAGTTTAT TtTCTTTtCC tCCAAGTtGT AATtGGcTTT	800	
ATAAgACCTt CATAGCCGAT CAataCAACG AaGCAAGTtG gATATATTTT	850	
CCGACCTTGT ATTCTCTCTC ATGKGCCCCT TATTATGTTT GCGCCATGAG	900	
CGCCTACCCA AGAKGAGCCA TAAGCATAAG GCTCATCCAC CTATTGGCCA	950	
CGACTACTGT TGGAAATATT CCCTACAKGC AATATTGKGA KGAWAAWATT	1000	
TATCTATAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAA		

Abb. 8.15 Virtuelle full length-Sequenz von Bci-4 (s. 3.4.1).

Nach 3'- und 5'-RACE wurde die Sequenz des SSH-cDNA-Fragmentes von *Bci-4*, die das offene Leseraster des Gens umspannt, identifiziert. Die Sequenz des ursprünglichen cDNA-Klons ist unterstrichen, das erste Stopcodon im 5'-Terminus (TAG), das *in frame* folgende erste Startcodon (ATG=Methionin), die RACE-Primer gsp2 (in 3'-Richtung verlängert) und die komplementäre Sequenz zu ngsp1 (in 5'-Richtung verlängert), sowie das Stopcodon am 3'-Terminus (TGA) sind in fetten Buchstaben dargestellt.

4-62_	TCAGGATCATAGCTACAGGCGACA ATG CCCCGGTCATCGACAATCGCTGGCAGCGGC'TTCT	60
ORF1_	----- TAGGATCCATGCCCCGGTCATCGACAATCGCTGGCAGCGGC'TTCT	44
ORF2_	----- TAGGWTCC ----- CCCCGGTCATCGACAATCGCTGGCAGCGGC'TTCT	41

4-62_	CTGAAGCTACCATCTCTTCTGCTTCTGTGGATCTTTAGCTGGAAC TGGGGGCATGCCGTG	120
ORF1_	CTGAAGCTACCATCTCTTCTGCTTCTGTGGATCTTTAGCTGGAAC TGGGRCATGCCGTG	104
ORF2_	CTGAAGCTACCATCTCTTCTGCTTCTGTGGMTCTTTAGCTGGAAC TGGGGGCATGCCGTG	101

4-62_	GCCAAGTTTGATCCTGCAAACATGACGGAGCTTCAGAAACATGTCTCCTTTTTCGACCGG	180
ORF1_	GCCAAGTTTGATCCTGCAAACATGACGGAGCTTCAGAAACATGTCTCCTTTTTCGACCGG	164
ORF2_	GCCMAGTTTGATCCTGCMACATGACGGAGCTTCAGAAACATGTCTCCTTTTTCGACCGG	161

4-62_	AACAAGGATGGCTTCATCACTCCTACAGAAACCATCCAAGGGTTTGTGTGCAATCGGTTGC	240
ORF1_	AACAAGGATGGCTTCATCACTCCTACAGAAACCATCCAAGGGTTTGTGTGCAATCGGTTGC	224
ORF2_	AACAAGGATGGCTTCATCACTCCTACAGAAACCATCCAAGGGTTTGTGTGCAATCGGTTGC	221

4-62_	GAGTATGCATTTGCTACTGCTGCCTCTGCCGCCATTACGGTGCCCTTGCTCCTCAAACA	300
ORF1_	GAGTATGCATTTGCTACTGCTGCCTCTGCCGCCATTACGGTGCCCTTGCTCCTCAAACA	284
ORF2_	GAGTATGCATTTGCTACTGCTGCCTCTGCCGCCATTACGGTGCCCTTGCTCCTCAAACA	281

4-62_	ACCCCGGCTGGTACACCACTGCCTCACTTGACAATATACGTAGAGAATATCCACAAAGCT	360
ORF1_	ACCCCGGCTGGTACACCACTGCCTCACTTGACAATATACGTAGAGAATATCCACAAAGCT	344
ORF2_	ACCCCGGCTGGTACACCACTGCCTCACTTGACAATHTACGTWGAGAWTATCCACAAAGCT	341

4-62_	ATGCATGGAAGTGATTCAAGGTGTATATGATGCCAAAGGAAGGTTTCTTCCCCAAAAC'TTT	420
ORF1_	ATGCATGGAAGTGATTCAAGGTGTATATGATGCCAAAGGAAGGTTTCTTCCCCAAAAC'TTT	404
ORF2_	ATGCATGGRAGTGATTCAAGGTGTWTATGATGCCAAAGGRAGGTTTCTTCCCCAAAAC'TTT	401

4-62_	GAGGAATTATTCAAACATATGCAATACTCCGACCAGATGCGTTGACTCTTGCGGAGATG	480
ORF1_	GAGGAATTATTCAAACATATGCAATACTCCGACCAGATGCGTTGACTCTTGCGGAGATG	464
ORF2_	GAGGAATTWTTCMAAACATATGCAATACTCCGACCMGATGCGTTGACTCTTGCGGAGATG	461

4-62_	CATGTGATGCTCTTTGCAAAACGGGATCTAGACCCTATATCATGGGCACCACCACAGGTT	540
ORF1_	CATGTGATGCTCTTTGCAAAACGGGATCTAGACCCTATATCATGGGCACCACCACAGGTT	524
ORF2_	CATGTGATGCTCTTTGCVAAACGGGRTCTAGACCCTATATCATGGGCMCCACCACAGGTT	521

4-62_	GAGTGGGGCCTATTATTACGCTTGCAAGCGATTGGCTTGGGTTTCCTTCACAAAGACAGT	600
ORF1_	GAGTGGGGCCTATTATTACGCTTGCAAGCGATTGGCTTGGGTTTCCTTCACAAAGACAGT	584
ORF2_	GAGTGGGGCCTATTATTCMCGCTTGCAAGCGATTGGCTTGGGTTTCCTTCACAAAGACAGT	581

4-62_	GTTAGAGGTATATATGATGGAAGCCTGTTTATCAAGTTGGAAAAGAAATGGCACCC'TTTT	660
ORF1_	GTTAGAGGTATATATGATGGAAGCCTGTTTATCAAGTTGGAAAAGAAATGGCACCC'TTTT	644
ORF2_	GTTDRAGGTATATMTGATGGRAGCCTGTTTHTCAAGTTGGAAAAGAAATGGCMCCCTTTT	641

4-62_	CAAAGTGCTATGCGAT TGA ACTTGG-TGCTAGTTT AGAGTGAGAGT TTGGATATGGAAAGG	719
ORF1_	CAAAGTGCTATGCGAT TGA CTTGG-T GC TAGTTT AGAGTGAGAGAAGCTT -----	693
ORF2_	CAAAGTGCTATGCGRT GAA CH TNGGTGCTAGTTTAGAGTGAGAGRRGCTT -----	691

4-62_	TTGGAAATATT//AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	1036
ORF1_	-----//-----	
ORF2_	-----//-----	

Abb. 8.16 Alignment des virtuellen full length-Klon von *Bci-4* (4-62) mit den über RT-PCR identifizierten Klonen ORF1 und ORF2 (s. 3.4.1).

RT-PCR-Primer sind in ORF1 und ORF2 in fetten Buchstaben dargestellt, die angehängte Restriktionsschnittstelle ist jeweils unterstrichen. Das Start- und Stopcodon des ORF ist in der Sequenz des full length-Klons (4-62) in fetten Buchstaben dargestellt.

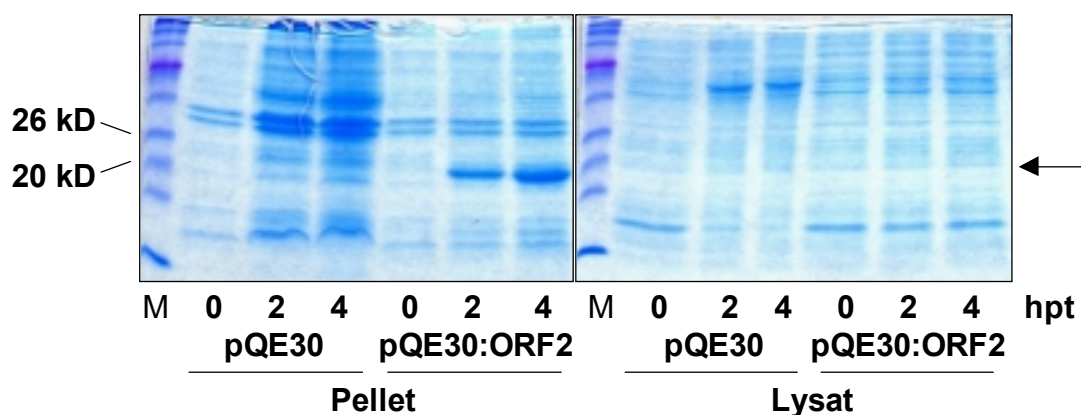


Abb. 8.17 Akkumulation des rekombinanten Proteins von BCI-4 in Bakterienkultur (s. 3.4.2).

Expressionskulturen wurden mit Klon pQE30:ORF2 bzw. leeren pQE30-Vektor enthaltenden Bakterien angeimpft und Aliquots direkt vor (0 hpt) und 2 und 4 hpt nach Induktion der Expression des rekombinanten Proteins entnommen. Proben wurden nach der Aufarbeitung jeweils getrennt in Bakterienzellpellet (Pellet) und Überstand (Lysat) in SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und die Akkumulation von Protein mittels Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Als Molekularmarker (M) wurde ein vorgefärbter Proteinstandard (9-182 kD) verwendet.

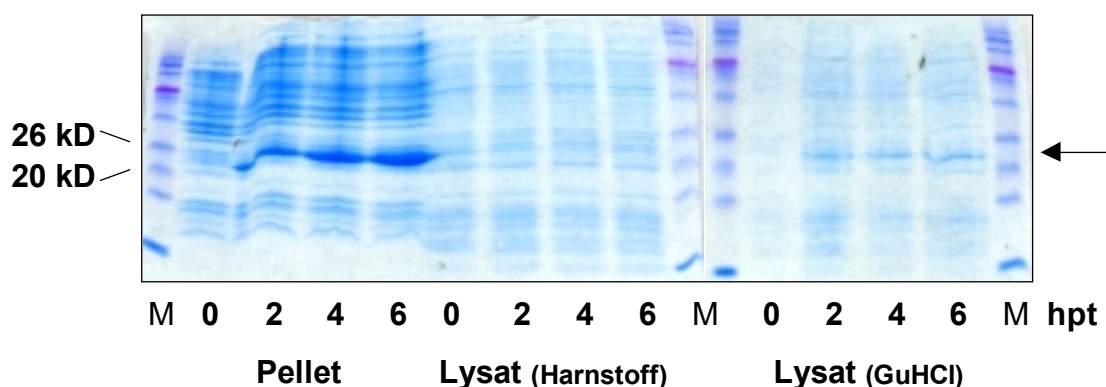


Abb. 8.18 Extraktion des rekombinanten Proteins von BCI-4 aus *E. coli* (s. 3.4.2).

Expressionskulturen wurden mit Klon pQE30:ORF2 enthaltenden Bakterien angeimpft und Aliquots direkt vor (0 hpt) und 2, 4 und 6 hpt nach Induktion der Expression des rekombinanten Proteins entnommen. Proben wurden mit 8 M Harnstoff- bzw. 6 M GuHCl-Lysepuffer aufgearbeitet. Das Bakterienzellpellet (Pellet, gezeigt nur von Harnstoffextraktion) und die jeweiligen Überstände (Lysat) wurden in SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und die Akkumulation von Protein mittels Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Als Molekularmarker (M) wurde ein vorgefärbter Proteinstandard (9-182 kD) verwendet.

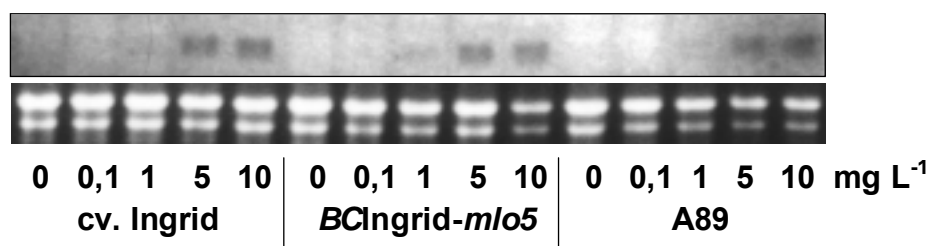


Abb. 8.19 Genotypenunabhängige Transkriptakkumulation von *Bci-4* nach Applikation unterschiedlicher DCINA-Konzentrationen (s. 3.4.3.1).

Sechs Tage alte Gerstenkeimlinge cv. Ingrid, *BCIngrid-mlo5* und A89 wurden mit 0,1, 1, 5, oder 10 mg L⁻¹ DCINA bzw. der Leerformulierung (WP, 0) bezogen auf das Bodenvolumen behandelt und zwei Tage danach Primärblätter geerntet. Nach gelelektrophoretischer Trennung (7,5 µg RNA pro Spur) und Herstellung von *Northern Blots* wurde die mRNA mit *Bci-4*-Sonde hybridisiert. Die gleichmäßige RNA-Beladung des Gels wurde anhand EtBr⁻-vermittelter Fluoreszenz der ribosomalen RNA unter UV-Licht überprüft.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Karl-Heinz Kogel danke ich für die Bereitstellung des Themas, die engagierte Betreuung, die Unterstützung und das Interesse an der Arbeit. Seine vielfältigen Impulse haben diese Dissertation stets begleitet.

Herrn Prof. Dr. K. Zetsche danke ich herzlich für die Übernahme des Coreferates dieser Dissertation auch nach seiner Emeritierung.

Bei Dr. Gregor Langen bedanke ich mich für die Betreuung der Arbeit, seine stets hilfsbereite Unterstützung bei technischen und methodischen Fragestellungen, seinen vielfältigen Anregungen zum Fortgang der Arbeit und die kritische und hilfreiche Durchsicht des Manuskriptes.

Dr. Ralph Hückelhoven gilt mein besonderer Dank für seine stete Diskussionsbereitschaft, seine wertvollen Anregungen, die freundschaftliche Zusammenarbeit sowie für die kritische und hilfreiche Durchsicht des Manuskriptes. Der von ihm geleistete Methodentransfer des transienten Transformationssystems hat wesentliche Teile dieser Arbeit erst ermöglicht.

Allen MitarbeiterInnen des Institutes für Phytopathologie und Angewandte Zoologie danke ich für die äußerst angenehme Arbeitsatmosphäre, die tatkräftige Unterstützung und die schöne gemeinsame Zeit. Bei Elke Stein möchte ich mich besonders für die gute Zusammenarbeit und freundliche Unterstützung bei der Durchführung von Versuchen bedanken. Ebenso gilt mein Dank Martina Düringer und Ruth Eichmann für ihre vielfältige Hilfe und die Erleichterung des Laboralltags. Birgit Jarosch, Uli Beckhove, Kathrin Michel, Ralph Hückelhoven, Jagdish Kumar und Lorant Király danke ich für das zur Verfügung stellen von Probenmaterial. Bei Birgit Jarosch bedanke ich mich außerdem für die geleistete Arbeit, auf die meine Arbeit weiter aufbauen konnte.

Anne Pflug bin ich für den ausdauernden und hilfreichen Beistand bei der Formatierung und bei der Beratung im Layout des Manuskriptes sehr dankbar.

Ich danke meinen Freunden und Freundinnen, meiner Familie und Schwiegerfamilie und ganz besonders meinem Verlobten Christoph Mayer für die Unterstützung, das Interesse, die Ermutigungen und Ablenkungen in allen Phasen meiner Promotion.

CURRICULUM VITAE

Persönliche Daten

Katrin Beßer
geboren am 28. Februar 1970 in Duisburg
Staatsangehörigkeit: deutsch

Berufstätigkeit

September 1997 - Februar 2001	Wissenschaftliche Hilfskraft bzw. wissenschaftliche Angestellte am Institut für Phytopathologie und Angewandte Zoologie der Justus-Liebig-Universität Gießen
Juli 1996 - August 1997	Wissenschaftliche Hilfskraft an den Instituten für Pflanzenökologie, für Botanik I, für Phytopathologie und Angewandte Zoologie der Justus-Liebig-Universität Gießen

Bildungsgang

September 1997 - Mai 2001	Promotion am Institut für Phytopathologie und Angewandte Zoologie der Justus-Liebig-Universität Gießen
Oktober 1989 - Juni 1996	Studium der Biologie (Dipl.), Justus-Liebig-Universität Gießen Abschluss: Diplom-Biologin Thema der Diplomarbeit: „Auswirkungen von Ozon und phytopathogenen Pilzen auf <i>Avena sativa</i> L. hinsichtlich der Bildung von Radikalen und Phytoalexinen“
Juli 1980 – Juni 1989	Besuch des Reinhard-und-Max-Mannesmann-Gymnasium, Duisburg-Huckingen Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
Juli 1976 - Juni 1980	Besuch der Grundschule Am Tollberg, Duisburg-Wanheim